

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Microbiología II



## TESIS DOCTORAL

**Estudio serológico, microbiológico y molecular de "Streptococcus gallolyticus" subsp. "gallolyticus", asociado al cáncer colorrectal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Beatriz Romero Hernández**

Directores

Rosa del Campo Moreno  
Rafael Cantón Moreno

**Madrid, 2014**



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología II

**Estudio Serológico, Microbiológico y Molecular de**  
***Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus***  
**Asociado al Cáncer Colorrectal**

Tesis doctoral presentada por

**Beatriz Romero Hernández**

Para la obtención del grado de Doctor

Los directores del trabajo

**Dra. Rosa del Campo Moreno**

**Dr. Rafael Cantón Moreno**

Servicio de Microbiología



Memoria presentada en la Facultad de Farmacia  
de la Universidad Complutense de Madrid  
por Dña. Beatriz Romero Hernández  
para la obtención del grado de doctor

## **Directores**

Dra. Rosa del Campo Moreno. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS).

Dr. Rafael Cantón Moreno. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Profesor Asociado. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.



**Rosa del Campo Moreno**, Investigador Estabilizado en el IRYCIS en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, y

**Rafael Cantón Moreno**, Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid,

Por la presente certifican que la memoria titulada “**Estudio Serológico, Microbiológico y Molecular de *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Asociado al Cáncer Colorrectal**”, ha sido realizada bajo nuestra dirección por la doctoranda Beatriz Romero Hernández en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal, y estimando que se encuentra finalizada y en condiciones de optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, se solicita sea admitida a trámite para su lectura y defensa pública.

Madrid, a 20 de Enero de 2014

Dra. Rosa del Campo Moreno

Dr. Rafael Cantón Moreno



A mi gran familia





## Agradecimientos

**Cada persona que, de alguna manera, forma o ha formado parte de nuestras vidas, deja su huella. Hoy sólo tengo palabras de agradecimiento para todas ellas porque han enriquecido mi mundo, y lo siguen haciendo día a día.**

Especialmente agradecer el apoyo y el cariño continuo a la Dra. Rosa del Campo. Pocas personas conozco con tanta fuerza, y con esa energía y alegría que desprendes. Te has convertido en un ejemplo, tanto a nivel profesional como personal, para todos nosotros. Te quiero.

En segundo lugar, al Dr. Rafael Cantón por la oportunidad y la confianza depositada en mí, de otra manera esto no hubiera sido posible. Tu dedicación y la satisfacción por el trabajo bien hecho te caracterizan. Gracias.

Gracias a las Dras. Nuria Aragonés y Beatriz Pérez-Gómez, del Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, por la confianza y por embarcarnos en el estudio MCC-Spain. Una parte muy importante de esta tesis es gracias a vosotras.

A Julia Butt y a todo el laboratorio del Dr. Michael Pawlita, del DKFZ, Heidelberg (Alemania). Muchas gracias por la ayuda y el interés que pusisteis en este proyecto desde el principio y por supuesto, el cariño con que me acogisteis en vuestro laboratorio. Gracias también al grupo del Dr. Tjalsma por contribuir a que nuestro trabajo siguiera adelante, cediendo los sueros y antígenos de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y *S. Typhimurium*.

Gracias también al Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal por su apoyo, especialmente a la Unidad de Genómica que ha participado activamente en esta tesis.

A José Francisco, muchas gracias por tu valiosa ayuda, pero esencialmente por tu dedicación y el interés que has mostrado desde el primer momento por el proyecto.

Pero principalmente a todo al Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal por acogerme con los brazos abiertos a mí llegada a Madrid. Nunca me imaginé que aquí viviría momentos tan especiales. Habéis conseguido que cambie mi forma de pensar y de ver las cosas. He aprendido y he recibido tanto de cada uno de vosotros que habéis llegado a convertiros en parte de mi familia. Os estoy tan agradecida...

A María Galvéz, por tu amistad y tu cariño. Parte fundamental de mi vida. Te quiero mucho.

A Juanma y Gustavo que desde el principio cuidasteis tanto de mí. Junto a vosotros he vivido una de las etapas más importantes de mi vida. Gracias por vuestra amistad.

A Ana Sánchez, gracias por tu generosidad. Tienes la habilidad de sacar lo mejor de cada persona. Junto a ti he crecido profesional y personalmente.

A María Díez y Juande, únicos e irrepetibles. Gracias por todo.

Y a todos los residentes que formaron y forman parte del Servicio de Microbiología. Ellos han hecho y siguen haciendo que todos los madrugones y todo el trabajo merezca la pena. A Desirée, Ana Luisa, Adri, Claudio, María Bordallo, Irene Merino, Lorena, Laura, Rubén, Sergio, Luis, Raquel, José María, Maruxi, Bea Arbolella, Lourdes y Leticia, muchas gracias a todos por todo lo vivido junto a vosotros.

A Ana Sofía, siempre dispuesta a ayudarme con su mejor sonrisa. Gracias por tus sabios consejos, por tu ayuda y contribución en esta tesis, pero básicamente por tu amistad y tu cariño.

A Mario, gracias por estar siempre ahí.

Y por supuesto, a todos aquellos que trabajan en la parte de investigación por vuestra ayuda, paciencia y todos los buenos momentos compartidos. Muchas gracias a: Merche, Arancha, María García, Carmen, Marta Cobo, Marta Hernández, Irene, Aida, Ana Moreno, Marta, Elia, Patricia, Gabriela, Conchi, Tania...

Por último, agradecer a todos los que un día fueron mis adjuntos, especialmente a la Dra. Marisa Morosini, a la Dra. María Meseguer y al Dr. Enrique Gómez-Mampaso, la importancia de mantener la ilusión y la pasión en nuestro trabajo.

También quería agradecer a todos los amigos que me acompañan ya desde hace tantos años: Elena, Toya, Nuria, Elisa, Elier, Carlos, María, Mamen, Carmen, Ana Santos, Javi, David, Alejandro, Miriam, Teresa, Estela... Con vosotros he crecido, muchísimas gracias por vuestra amistad y vuestro amor.

Y la parte primordial de mi vida: mi familia. Gracias, a cada uno de vosotros. Referente y refugio, no me puedo sentir más querida. Para mis padres. He aprendido tanto a valorar el esfuerzo que habéis realizado a lo largo de vuestra vida que cada día os quiero más. A mis hermanas, que siempre han cuidado de mí y me han apoyado tanto, especialmente a ti, Lucía. Y a mis sobrinos que llenan de alegría nuestras vidas. Os adoro.

**Lo que está destinado a ser, siempre encontrará una forma única, mágica y maravillosa para manifestarse... Yo hoy lo he conseguido, y a pesar de que llegar hasta aquí no ha resultado sencillo, con vuestra ayuda y vuestro cariño ha sido posible. Gracias de corazón!!**

**Beatriz Romero Hernández.**

---

# Índice

---

Lo que a veces parece un  
final...

---



<b>I.- ANTECEDENTES DEL TEMA.....</b>	<b>17</b>
1.- Cáncer colorrectal.....	20
2.- Microbiota gastrointestinal y cáncer colorrectal.....	23
2.1.- Microbiota gastrointestinal.....	23
2.2.- Papel de la microbiota en el desarrollo del cáncer colorrectal.....	27
3.- Complejo <i>Streptococcus bovis/equinus</i> .....	28
3.1.- Taxonomía.....	29
3.2.- Clínica.....	31
3.3.- Epidemiología y patogenia.....	34
3.4.-Sensibilidad antibiótica.....	36
4.- <i>Helicobacter pylori</i> .....	38
5.- <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium.....	41
6.-Proyecto MCC-Spain.....	42
7.-Serología relacionada con infecciones asociadas a cáncer.....	44
7.1.-Ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).....	44
7.2.-Serología Múltiple.....	45
8.- Nuevas técnicas de identificación bacteriana.....	47
8.1.- Identificación bacteriana mediante MALDI-TOF MS.....	47
8.2.- Secuenciación de genomas bacterianos.....	48
<b>II.- OBJETIVOS.....</b>	<b>50</b>
<b>III.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
1.-Estudio serológico.....	57
1.1.-Ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).....	57
1.1.1.- Selección de sueros.....	57
1.1.2.- Desarrollo de la técnica.....	57
1.2.-Serología Múltiple.....	58
1.2.1.- Selección de sueros.....	58
1.2.2.- Preparación y selección de las cepas bacterianas y proteínas purificadas utilizadas para el estudio.....	59
1.2.3.- Unión extracto proteínas de la membrana procedente de un cultivo bacteriano o proteínas recombinantes a las microesferas.....	59
1.2.3.1.- Unión de las proteínas directamente a las microesferas.....	59
1.2.3.2.- Unión proteínas a las microesferas, previamente unidas a glutatión-caseína (GT-microesferas).....	60
1.2.4.- Luminex.....	60
1.2.5.- Análisis de los datos.....	61

2.- Reclasificación taxonómica y análisis genético de los aislados de <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> .....	62
2.1.- Cepas bacterianas.....	62
2.2.- Sensibilidad antibiótica.....	62
2.3.- Técnicas moleculares.....	63
2.3.1 Extracción de ADN.....	63
2.3.2.- Amplificación de ADN.....	63
2.3.2.1.- PCR convencional.....	63
2.3.2.2.- Caracterización del Tn1546 mediante PCR solapante.....	64
2.3.3.- Separación de ADN.....	65
2.3.3.1.- Electroforesis en corriente continua.....	65
2.3.3.2.- Electroforesis en corriente alterna o electroforesis de campo pulsado (PFGE).....	65
2.3.3.3.- Tinción y visualización.....	66
2.3.3.4.- Purificación y secuenciación de ADN.....	66
2.3.3.5.- Análisis bioinformático.....	67
2.4.- Identificación bacteriana mediante MALDI-TOF MS.....	67
2.5.- Hibridación.....	67
2.5.1.- Extracción de ADN.....	68
2.5.2.- Separación de los fragmentos de ADN.....	68
2.5.3.- Transferencia y fijación del ADN a una membrana.....	69
2.5.4.- Obtención y marcaje de la sonda.....	69
2.5.5. Hibridación radioactiva.....	69
2.5.6.- Revelado.....	70
2.6.- Transferencia del elemento genético Tn1546.....	70
3.- Secuenciación del genoma y análisis bioinformático de la cepa número 78 de <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> resistente a los glucopéptidos.....	70
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
1.- Resultado del estudio serológico.....	75
1.1.- Respuesta inmunitaria a <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> y <i>S. Typhimurium</i> y cáncer colorrectal.....	75
1.1.1.- Respuesta inmunitaria a las proteínas específicas Gallo1569, Gallo2039, Gallo2178 y Gallo2179 de <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> y cáncer colorrectal.....	76
1.1.2.- Respuesta inmunitaria a <i>S. Typhimurium</i> y cáncer colorrectal...	81
1.2.- Respuesta inmunitaria a <i>H. pylori</i> y cáncer colorrectal.....	82
1.2.1.- Estudio de la sero-prevalencia de <i>H. pylori</i> mediante ELISA....	82

1.2.2.- Estudio de la sero-prevalencia mediante Serología Múltiple.....	83
1.2.3.- Comparación ELISA <i>vs</i> Serología Múltiple.....	83
1.3.- Relación de <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> , <i>S. Typhimurium</i> y <i>H. pylori</i> y cáncer colorrectal.....	85
2.- Reclasificación taxonómica.....	86
2.1.- Características clínicas de los pacientes.....	91
2.2.- Estructura poblacional de los aislados de <i>S. bovis</i> .....	92
2.3.- Sensibilidad a antibióticos.....	93
3.- Estudio de la diversidad genética y sensibilidad antimicrobiana de los aislados de <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> de origen humano y animal.....	94
3.1.- Estructura poblacional de los aislados de <i>S.gallolyticus</i> subp. <i>gallolyticus</i> .....	94
3.2.- Sensibilidad a antibióticos.....	96
3.3.- Caracterización del elemento genético Tn1546.....	97
3.4.- Transferencia del material genético Tn1546.....	97
3.5. Localización del gen <i>vanA</i> .....	97
4.- Análisis del genoma de la cepa número 78 de <i>S. gallolyticus</i> subp. <i>gallolyticus</i> resistente a los glucopéptidos.....	98
<b>V. DISCUSION</b> .....	103
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	119
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	123
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	139
- Abstract.....	141
- Abreviaturas.....	143
- Listado de Figuras.....	145
- Listado de Tablas.....	149





---

# Antecedentes del tema

---

“Quiero compartir con ustedes el  
secreto que me ha llevado a alcanzar  
todas mis metas: mi fuerza reside  
únicamente en mi tenacidad”

---

Louis Pasteur

---



## I.- ANTECEDENTES DEL TEMA Y JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

La característica común a todos los procesos cancerígenos es la existencia de una proliferación anormal y descontrolada de las células. Su etiología suele ser casi siempre desconocida y multifactorial, siendo escasos los cánceres en los que se ha encontrado una asociación directa con la exposición previa a agentes ambientales o a microorganismos. El tracto gastrointestinal alberga una gran variedad de microorganismos en equilibrio ecológico, sin embargo, se sospecha que algunas de estas especies podrían contribuir a crear un microclima pro-carcinogénico favoreciendo procesos mutagénicos y daño celular. Los mecanismos bacterianos implicados son la inflamación crónica y la producción de metabolitos carcinógenos (Parsonnet, 1995). La etiología infecciosa del cáncer ha sido ampliamente demostrada en el cáncer cervical y en el cáncer gástrico causados por el virus del papiloma humano y por *Helicobacter pylori*, respectivamente.

Curiosamente, la porción del tracto gastrointestinal que presenta una mayor densidad de colonización bacteriana es el colon, siendo a su vez la más afectada por cáncer (Jemal y cols., 2009). La progresión del cáncer está acompañada por cambios que afectan a la integridad de la mucosa colónica, incluyendo, entre otras cosas, una reducida producción de moco (Johansson y cols., 2008) y un aumento de la permeabilidad epitelial (Soler y cols., 1999). Estas alteraciones producidas durante el proceso cancerígeno también provocan cambios en la microbiota (Boleij y cols., 2012). Existe una estrecha relación entre endocarditis/bacteriemia por *Streptococcus bovis* y la existencia de cáncer colorrectal (CCR) que fue documentada por primera vez hace 50 años (McCoy y Manson, 1951) y es de especial interés en clínica para el diagnóstico, manejo y tratamiento de los pacientes. En los últimos años se han realizado numerosos cambios taxonómicos relacionados con *S. bovis*, identificándose a *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* como la subespecie bacteriana estrechamente relacionada con el CCR (Devriese y cols., 1998). Sin embargo, su asociación ha estado infraestimada, principalmente por una inadecuada identificación (Abdulmir y cols., 2011). Actualmente, contamos con técnicas moleculares basadas en la secuenciación de ADN que nos permiten clasificar correctamente estas especies y facilitan el análisis de los estudios epidemiológicos (Romero y cols., 2011).

*H. pylori* es un microorganismo estrechamente relacionado con el cáncer de estómago, aunque todavía falta por esclarecer la implicación que este microorganismo puede tener en el desarrollo del CCR. Uno de los posibles mecanismos sugeridos es la producción de hipergastremia como consecuencia de la inflamación de la mucosa gástrica por la colonización persistente de *H. pylori*. Es la hipergastremia, la que está considerada como uno de los factores de riesgo en el desarrollo de CCR (Renga y cols., 1997). Por último, se han relacionado también con el CCR otras especies potencialmente patógenas de la Familia *Enterobacteriaceae*, como es el caso de *Salmonella* spp (Tjalsma y cols., 2012). Obviamente, se hace necesario la realización de más estudios para dilucidar la interacción entre la compleja microbiota y los factores genéticos del hospedador y sus efectos en el desarrollo de la oncogénesis humana, así como esclarecer los mecanismos responsables de la desregulación de la respuesta inmunitaria y su contribución a la transformación neoplásica.

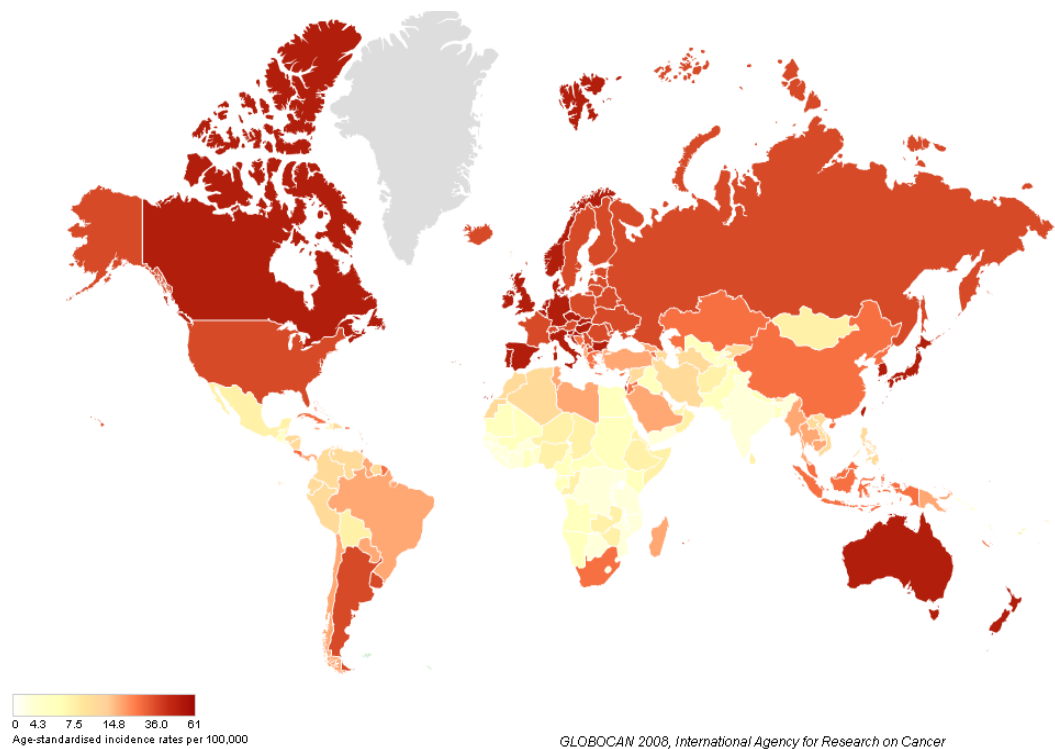
En este sentido y aprovechando el potencial del estudio multicaso-control poblacional MCC-SPAIN (<http://mccspain.org>) que estudia la influencia de factores ambientales y su interacción con factores genéticos en tumores frecuentes o con características epidemiológicas peculiares en España, se ha puesto en marcha también el primer estudio serológico de este tipo con el fin de conocer mejor la asociación entre estos tres microorganismos y el CCR. En este trabajo se ha puesto a punto un nuevo esquema de detección serológica que utiliza la tecnología xMAP de Luminex, que permite la detección de anticuerpos frente a un amplio número de proteínas específicas de los distintos microorganismos en cuestión (Waterboer y cols., 2005).

## **1.- Cáncer colorrectal**

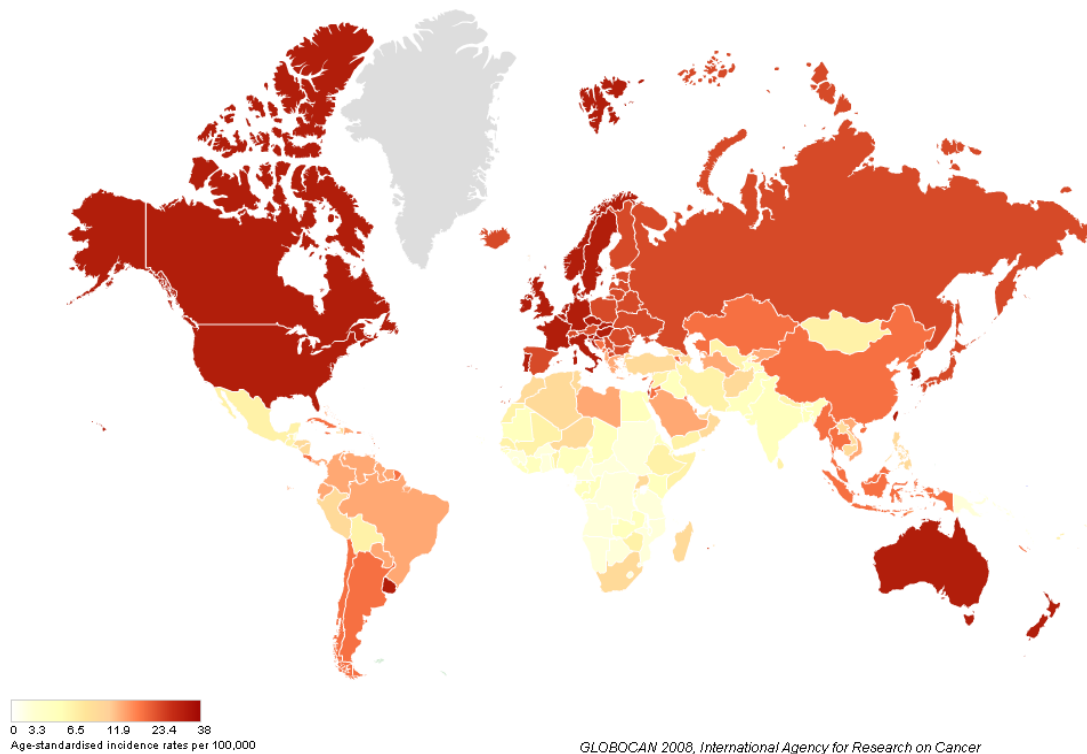
El CCR es aquel que se origina en el colon o en el recto. A estos cánceres se les puede denominar por separado cáncer de colon o cáncer de recto (rectal) dependiendo del lugar donde se originen. Tanto el cáncer de colon como el de recto comparten muchas características en común, de ahí que generalmente se analicen juntos (American Cancer Society, 2013). La patogénesis del CCR es muy heterogénea e incluye una cascada compleja de múltiples pasos (Vogelstein y cols., 1988). Es más común en individuos de mediana y avanzada edad, siendo los hombres los que presentan un mayor riesgo de desarrollar CCR. Existe a su vez, una mayor asociación con el tipo de dieta consumida (Redston, 2004).

A nivel mundial y según su frecuencia de presentación, el CCR es el cuarto cáncer que afecta a ambos sexos, siendo el tercero más frecuente en hombres (663.000 casos, 10,0% del total) y el segundo en mujeres (570.000 casos, 9,4% del total). Al menos el 60% de los casos se diagnostican en países desarrollados. La incidencia varía ampliamente dependiendo del sexo y de las condiciones socioeconómicas; así en Australia/Nueva Zelanda y el oeste de Europa se registran las tasas de incidencia más altas, mientras que las cifras menores se corresponden con países como África y Asia. Se estima que CCR es el responsable del 8% del total de todas las muertes por cáncer al año en el mundo. La mayor tasa de mortalidad se da en el centro y este de Europa (Ferlay y cols., 2008).

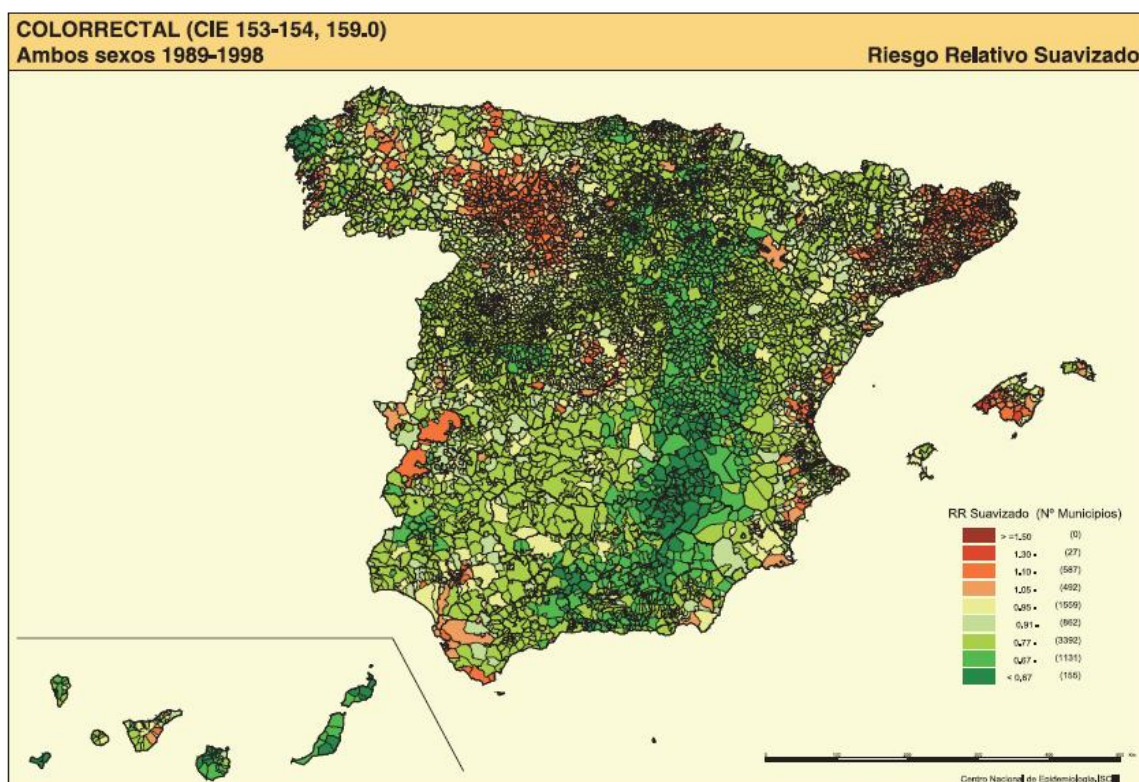
Los últimos estudios realizados en España revelan que en el año 2007, una de cada siete muertes causadas por cáncer fue debida a CCR, siendo el segundo cáncer más frecuente en hombres (después del cáncer de pulmón) y en mujeres (situándose detrás del cáncer de mama), y contabilizando un total de 13.495 muertes (Curado y cols., 2007). La evaluación realizada por EURO CARE (EUROpean CANcer REgistry-based study on survival and CARE of cancer patients) reveló importantes datos sobre su incidencia y su mortalidad. Cuando se computan ambos sexos conjuntamente, este cáncer pasa a ser el más prevalente (65.000 nuevos casos aproximadamente por año) (Sant y cols., 2009). El CCR presenta un patrón de distribución geográfica muy similar en hombres y mujeres. El patrón se caracteriza por un núcleo de municipios de mayor riesgo en Cataluña (Barcelona y Girona) y Baleares, en Castilla-León (León, Palencia) y Andalucía (municipios de Sevilla y Cádiz). El patrón parece más acentuado en mujeres y buena parte del riesgo parece concentrarse en los municipios más grandes (López-Abente y cols., 2006), como se puede apreciar en la figura 3.



**Figura 1.-** Incidencia estimada (casos nuevos por 100.000 habitantes y año) para cáncer colorrectal en hombres (<http://globocan.iarc.fr>).



**Figura 2.-** Incidencia estimada (casos nuevos por 100.000 habitantes y año) para cáncer colorrectal en mujeres (<http://globocan.iarc.fr>).



**Figura 3.-** Mapa de mortalidad para el CCR en la población española (Atlas Municipal de Mortalidad por Cáncer en España, 1989-1998).

Los factores hereditarios están presentes en un 10-15% de los casos (Schotenfeld y cols., 1996). Otros factores de riesgo descritos son el mayor consumo de carne y menor consumo de fibra. Se han referido como factores protectores el consumo de vegetales, fruta, fibra, calcio y aspirina. Aunque los resultados no son muy consistentes, se ha planteado el alcohol como posible factor de riesgo y en particular la cerveza (Sharpe y cols., 2002). El mecanismo patogénico postulado es la actuación de las bacterias intestinales sobre los ácidos biliares y grasas produciendo sustancias carcinogénicas. La dieta pobre en fibras condicionaría un tránsito intestinal más lento, aumentando el contacto de estos carcinógenos de la mucosa intestinal (Bingham y cols., 2003).

El notable incremento en la incidencia puede ser debido a estos cambios en los hábitos dietéticos de la población española, que incluyen un elevado consumo de azúcares y de carne roja unido a un bajo consumo de fibra (García-Closas y cols., 2006), así como una disminución de la actividad física. Otras causas relacionadas son los factores genéticos, como hemos comentado anteriormente, y el diagnóstico previo de Colitis Ulcerosa, estando relacionado el consumo de aspirina u otros anti-inflamatorios con una reducción del riesgo (Giovannucci y cols., 2006). Otros factores como la nuliparidad incrementarían el riesgo mientras que el uso de anticonceptivos orales y la terapia hormonal sustitutiva en mujeres posmenopáusicas contribuirían a reducir el riesgo de padecer este cáncer (Stewart y cols., 2003).

Cuando se habla de supervivencia, la cifras en nuestro país son del 53,6% a los 5 años, siendo ligeramente mayor en mujeres que en hombres: 54,5% *versus* 53,4%, respectivamente (Sant y cols., 2009). Según EURO CARE, en los últimos años se ha observado un incremento de la supervivencia, acercándonos a los valores descritos en el resto de países europeos (Verdecchia y cols., 2009).

Finalmente, los últimos estudios europeos publicados han estimado una disminución en la mortalidad del CCR en el periodo comprendido entre 2009-2013, principalmente debido a la implantación de programas de prevención y a los avances en el tratamiento. Mientras que en mujeres se habla de una disminución sustancial, los datos en hombres son menos claros y más heterogéneos, dependiendo fundamentalmente del país. Así pues, se prevé que en los próximos años ocurra una disminución cercana al 8% en países como Francia y Alemania, un 4% en Italia, pero sólo un 1% en España y Reino Unido. En Polonia, por el contrario, se espera un ligero incremento de la incidencia (alrededor del 1,4%) (Malvezzi y cols., 2013).

## 2.- Microbiota gastrointestinal y cáncer colorrectal

### 2.1.- Microbiota gastrointestinal

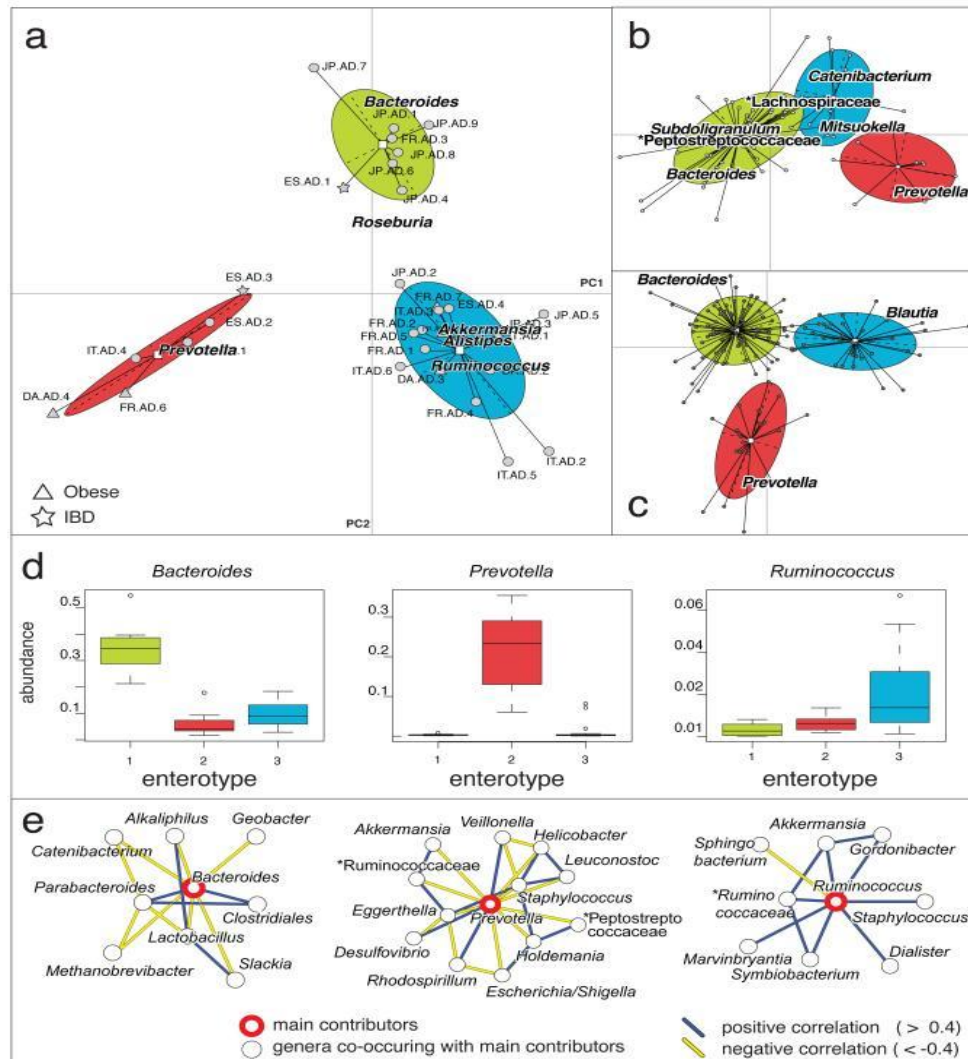
El tracto gastrointestinal humano alberga un complicado ecosistema compuesto por diferentes microorganismos que conviven en armonía con las células epiteliales y que se define como un órgano funcional llamado microbiota intestinal (Qin y cols., 2010). Las bacterias son la parte más numerosa de esta microbiota ( $\geq 100$  trillones) y superan en diez veces el número de células eucariotas de nuestro organismo, con una carga genética cien veces superior al genoma humano completo (Ashida y cols., 2012). La microbiota intestinal juega un papel clave en numerosos procesos metabólicos, fisiológicos, alimenticios e inmunológicos (O'Hara y Shanahan, 2006), y cambios en su composición influyen de manera directa en la salud de los seres humanos (O'Toole y Claesson, 2010). La mayor parte de estas bacterias son anaerobias estrictas y no han podido ser cultivadas nunca, pero gracias a las técnicas moleculares de secuenciación masiva cada vez conocemos más acerca de su existencia.

La mayoría de las bacterias pertenecen al Filo *Firmicutes* (incluyendo los géneros *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Ruminococcus*) o *Bacteroidetes* (géneros *Bacteroides* y *Prevotella*), que constituyen más del 90 % de las especies conocidas encontradas en el intestino humano (Qin y cols., 2010). Aunque exista una enorme variabilidad interindividual en la composición de la microbiota (Eckburg y cols., 2005; Hayashi y cols., 2003), se ha constatado la existencia de un grupo principal de bacterias presentes siempre en un porcentaje elevado en la población humana (Tap y cols., 2009). Así la microbiota de la mayor parte de individuos puede ser clasificada en tres variantes predominantes, o “enterotipos”, dominados por tres géneros diferentes: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, como se puede apreciar en la figura 4, y que son independientes de la edad, el sexo, la raza y el Índice de Masa Corporal (Arumugan y cols., 2011).

En este sentido, se ha definido como “núcleo individual” a los microorganismos que están siempre presentes en la microbiota de un individuo, mientras que aquellos que pueden ser detectados en la mayoría de las personas son llamados “núcleo común” (Zoetendal y



cols., 2008). Durante la edad adulta, la composición de la microbiota intestinal es relativamente estable a nivel de especie y predominan fundamentalmente los microorganismos anaerobios (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, y *Ruminococcus*) (Guarner y Malagelada, 2003).



**Figura 4.-** Diferencias filogenéticas entre “enterotipos” (Aruguman y cols., 2011).

La microbiota intestinal es imprescindible para obtener energía de la dieta y producir vitaminas (Tsai y Coyle, 2009; Tremaroli y cols., 2010). En el ser humano, se estima que la liberación de energía por parte de ésta es de aproximadamente el 10% de la energía absorbida, pero depende en gran medida de la dieta consumida (Savage, 1986). El genoma de nuestra microbiota intestinal, también conocido como microbioma, codifica numerosas funciones metabólicas que son únicas y no pueden ser llevadas a cabo por las células humanas, como por ejemplo, el procesamiento de componentes indigeribles de la dieta y de los polisacáridos de las plantas (figura 5).

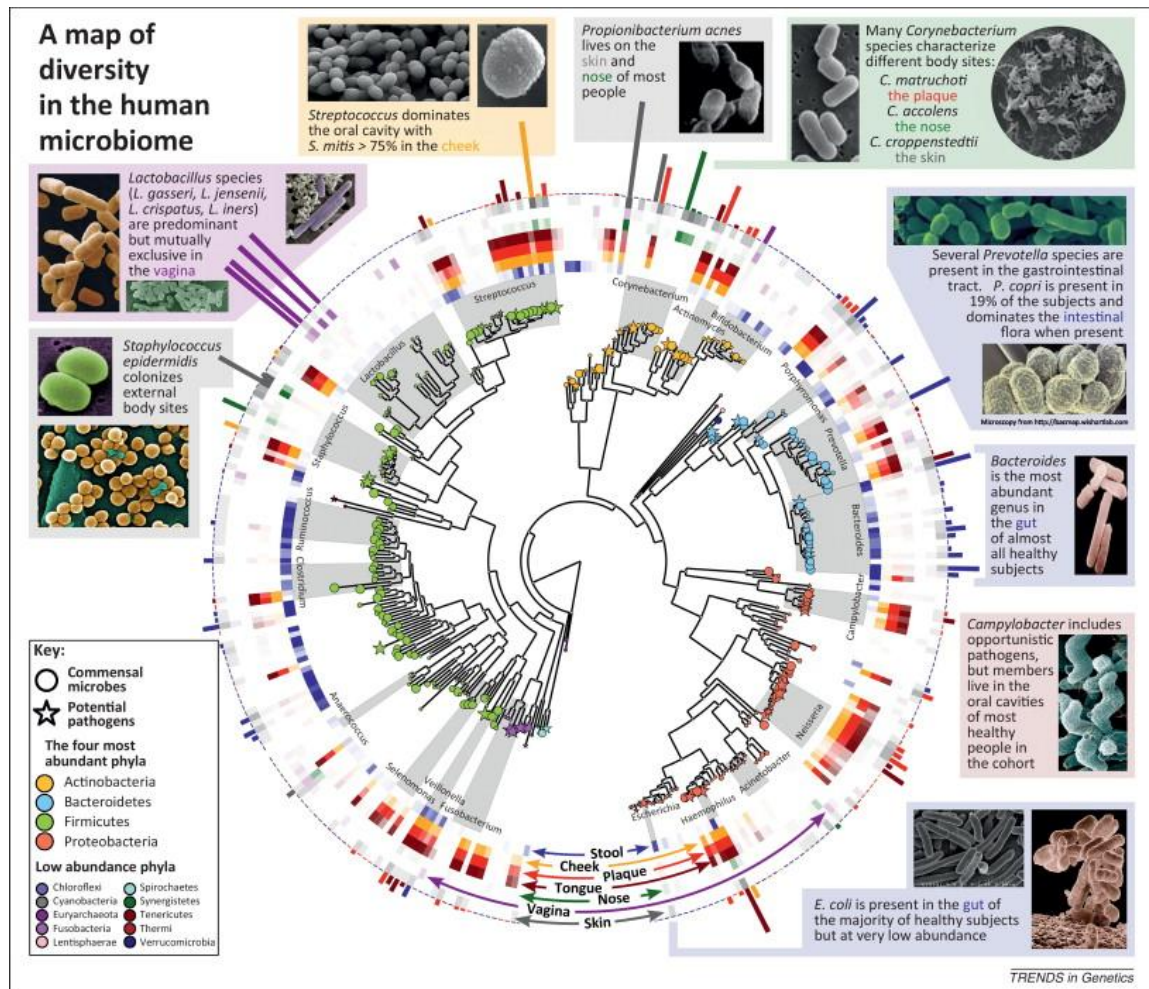
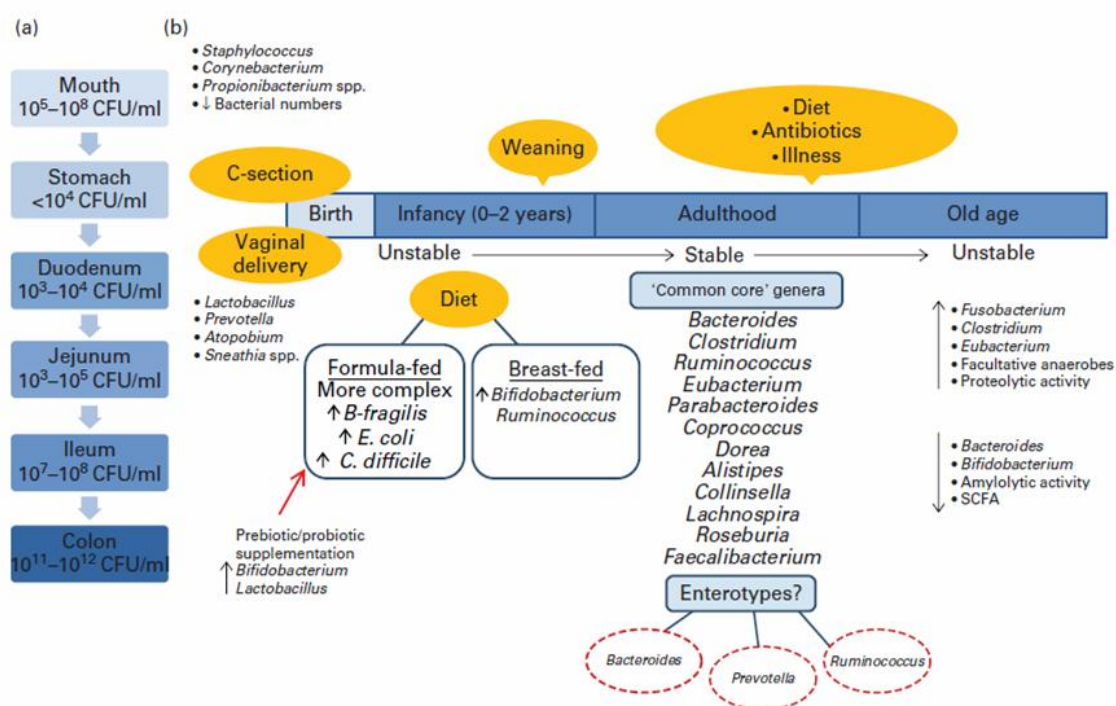


Figura 5.- Mapa de la diversidad del microbioma humano (Morgan y cols., 2013).

Por otra parte, se ha demostrado que la microbiota intestinal, junto a sus productos, interactúa con las vías metabólicas del hospedador, como por ejemplo controlando el gasto y el consumo de energía (Tilg, 2010). De esta forma, se ha visto que el consumo elevado de grasa en la alimentación aumenta la permeabilidad intestinal y la concentración de lipopolisacáridos bacterianos en plasma (Cani y cols, 2009) y que los cambios en la composición de la microbiota intestinal pueden producir alteraciones y la traslocación de esta endotoxina metabólica, que puede llevar a una inflamación generalizada. Adicionalmente, la ingestión elevada de grasas tiene un efecto directo proinflamatorio/antiinflamatorio, dependiendo de la naturaleza de los ácidos grasos, así como consecuencias inflamatorias a largo plazo relacionadas con la sobrecarga de tejido adiposo (Cani y cols, 2009). La microbiota constituye también un elemento muy importante en la barrera de defensa de la mucosa intestinal. Se ha demostrado que animales criados en un ambiente estéril son más propensos a padecer infecciones (Bauer y cols., 2006). Ésto se debe a que en un ecosistema estable constituido por bacterias comensales, éstas compiten con las bacterias patógenas por los nutrientes y los espacios libres. Además, el epitelio intestinal produce sustancias que inhiben a los microorganismos patógenos y a otras bacterias transitorias del exterior que no forman parte de la microbiota intestinal, limitando la colonización e invasión. Todo esto hace

que la microbiota tenga un papel muy importante a la hora de coordinar la respuesta inmunitaria del tracto gastrointestinal (Rakoff-Nahoum y Medzhitov, 2006).

Como hemos mencionado anteriormente, entre las funciones de la microbiota se encuentran la participación en el desarrollo del sistema inmune, el mantenimiento de la proliferación y la diferenciación celular, así como funciones metabólicas específicas como la digestión y la absorción de alimentos (Falk y cols., 1998). Sin embargo, la composición de esta microbiota varía a lo largo del tracto gastrointestinal en sus diferentes porciones, estableciéndose micro-ecosistemas intercomunicados entre sí y a su vez con el sistema digestivo (Ouwehand y Vesterhund, 2003).



**Figura 6.-** Cambios de la microbiota a lo largo de todo el tracto gastrointestinal: (a) Variaciones del número de bacterias a través del tracto gastrointestinal; (b) Factores que afectan en el establecimiento y mantenimiento de la microbiota, así como los que influyen en su composición (Power y cols., 2013).

Los factores que afectan a nuestra microbiota intestinal son de naturaleza muy variada. Algunos ejemplos los encontramos en el uso de terapia antibiótica, viajes, estrés o determinadas enfermedades; al igual que también algunos factores ambientales, como la dieta (Turnbaugh y cols., 2009).

El término “disbiosis” fue acuñado por Metchnikoff para describir la alteración o cambios bacterianos en nuestro intestino (Murray y Pizzorno, 1998). Posteriormente, ha sido definido por otros como: “cambios cualitativos y cuantitativos de la microbiota intestinal, tanto de su actividad metabólica como de su distribución local” (Holzapfel, 1998). Actualmente, la hipótesis sobre la disbiosis manifiesta que la dieta moderna y el estilo de vida, así como el empleo de antibióticos, conducen a la alteración de la microbiota normal intestinal. De esta



forma, dichos factores causarían modificaciones en el metabolismo bacteriano, así como el crecimiento excesivo de microorganismos potencialmente patógenos. El sobrecrecimiento de estas bacterias causa la liberación de productos o metabolitos potencialmente tóxicos desempeñando un papel importante en muchas enfermedades crónicas y degenerativas (Murray y Pizzorno, 1998). Algunas de las enfermedades asociadas con cambios de la microbiota son: la enfermedad intestinal inflamatoria, el síndrome del intestino irritable, el síndrome metabólico o la enfermedad del hígado graso (Dupont y Dupont, 2011).

## 2.2.- Papel de la microbiota en el desarrollo del cáncer colorrectal

Cada vez se atribuye más importancia al papel de la microbiota gastrointestinal en la génesis y el mantenimiento del CCR (Miki y cols., 2010). Tal y como ya ha sido demostrado para el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal, existe una fuerte asociación entre la inflamación crónica causada por bacterias y el desarrollo de enfermedades malignas (Balkwill y Mantovani, 2010). El tracto gastrointestinal está colonizado por numerosas especies bacterianas, por lo que es casi imposible responsabilizar del proceso de carcinogénesis a un único microorganismo. De hecho, a pesar de los avances en el desarrollo de nuevas técnicas moleculares, una gran parte de la microbiota no ha podido ser aún completamente identificada (Eckburg y cols., 2005; Bik y cols., 2006). Sin embargo, lo que sí podemos es identificar las especies bacterianas que promueven un microclima favorable con daño en la mucosa colónica (Parsonnet, 1995).

Existen algunos antecedentes que sugieren que el CCR podría estar causado por agentes infecciosos. El grupo de trabajo de Mager, encontró enzimas metiltransferasas de bacterias que inducían mutaciones en los genes de supresión de tumores (Mager, 2006). Otro de los grupos puso de manifiesto que parte de la microbiota podría comportarse como promotora mientras que, por contra, otra parte podría servir como represora del proceso de carcinogénesis (Killeen y cols., 2009). También se han descrito efectos antitumorales de las colicinas producidas por gramnegativos (Lancaster y cols., 2007), y se ha sugerido que la estimulación bacteriana en la producción de citoquinas podría ser el principal mecanismo inductor de cambios en la mucosa colónica y el responsable de la inflamación crónica (Castagnolia y cols., 2009; Ellmerich y cols., 2000).

A pesar de que no existen datos concluyentes, se sospecha de la implicación de *H. pylori* (Meucci y cols., 1997; Schmuely y cols., 2001) y de *S. bovis* en el CCR (Biarc y cols., 2004). Al igual que las cepas CagA-positivas de *H. pylori*, *S. bovis* induce una sobre-expresión de mediadores pro-inflamatorios (IL-8, prostaglandina E2 y ciclooxigenasa COX-2) asociados a carcinogénesis (Jüttner y cols., 2003). Si somos más rigurosos, teniendo en cuenta los últimos cambios realizados con respecto a *S. bovis*, *S. galloyticus* subsp. *galloyticus* ha sido relacionado con un incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias en la mucosa colónica de ratas (Abdulmir y cols., 2011). Otras bacterias como *Salmonella*, *Shigella* y *Citrobacter spp.*, etiológicamente causantes de diarrea, podrían contribuir al desarrollo de cáncer, ya que su persistencia en el tracto gastrointestinal induce una respuesta inflamatoria crónica (Maggio-Price y cols., 2009).

### 3.-Complejo *Streptococcus bovis/equinus*

En la actualidad, *S. bovis* forma parte de la microbiota gastrointestinal de humanos y animales y se agrupa dentro del complejo *Streptococcus bovis/equinus*. En él se incluyen tanto especies aisladas en infecciones humanas (*Streptococcus galloyticus*, *Streptococcus infantarius*) como animales (*S. bovis*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus alactolyticus*), aunque también podemos encontrar algunos aislados de productos alimentarios. *S. bovis* pertenece al serogrupo D de Lancefield y se caracteriza por crecer en presencia de bilis e hidrolizar la esculina.

En humanos, alrededor del 10% de *S. bovis*, forma parte de la microbiota gastrointestinal (Noble, 1978; Osawa y cols., 1995), aunque también pueden causar bacteriemia y endocarditis, principalmente en varones y personas de mayor edad (Durante-Mangoni y cols., 2008). Es más, desde 1951 se conoce la asociación entre un cuadro clínico de bacteriemia o endocarditis causada por *S. bovis* y la existencia oculta de cáncer (Mc Coy y Manson, 1951). Hay que destacar también la asociación de bacteriemia por este microorganismo y patología hepatobiliar (Tripodi y cols., 2004). Por ello, es fundamental una correcta identificación de los aislados de *S. bovis* en los laboratorios de microbiología clínica.

Además de causar enfermedades en humanos, *S. galloyticus* subsp. *galloyticus* también puede causar enfermedades en animales, como septicemia en palomas (De Herdt y cols., 1992), brotes en pollos (Chadfield y cols., 2007) o mastitis en el ganado (Garvie y Bramley, 1979). Pero independiente de su asociación a enfermedades, esta bacteria se encuentra en el rumen de mamíferos (Khafipour y cols., 2009) fermentando el almidón principalmente a ácido láctico, de especial interés en el desarrollo de acidosis láctica en el ganado que lleva una alimentación con exceso de almidón (Stewart y cols., 1997). También ha sido aislada en las heces de algunos animales, incluyendo el Koala (Osawa, 1990) o el gran ratón de campo japonés (Sasaki y cols., 2005).

El género *Streptococcus* es un grupo muy heterogéneo de especies anaerobias facultativas, catalasa y oxidasa negativos que puede presentar propiedades hemolíticas. El contenido en guanina y citosina en su cromosoma es bajo ( $G + C = 34 - 46 \text{ mol}\%$ ). Las distintas especies del género *Streptococcus* crecen bien en medios enriquecidos con sangre, suero o carbohidratos, a 35-37 °C, especialmente si se incuban en una atmósfera con 5-7% de dióxido de carbono. Algunas especies precisan la ausencia total de oxígeno para su crecimiento (Hardie, 1986).

La clasificación de los estreptococos en función de su hemólisis, aunque tiene sus limitaciones, se puede utilizar en una primera aproximación para la identificación en la práctica clínica. En agar sangre algunos aislados inducen la hemólisis completa alrededor de la colonia (beta-hemólisis), otros inducen una zona de coloración verdosa (alfa-hemólisis o hemólisis parcial), y finalmente otros no inducen ningún cambio (colonias no hemolíticas o gamma-hemolíticas). A su vez, dentro de esta clasificación, se distinguen varios serogrupos según la clasificación serológica de Lancefield, basada en los carbohidratos de la pared celular (Lancefield, 1933). En la tabla 1 aparecen reflejadas las diferentes especies de este género y las principales pruebas bioquímicas que las caracterizan.

**Tabla 1.-**Características fenotípicas de los principales grupos de *Streptococcus* spp.

Grupo	Voges-Proskauer	Esculina	Manitol	Sorbitol	Lactosa	Inulina	Hidrólisis arginina	Hidrólisis urea
<i>S. mitis</i>	-	V	-	V	+	v	v	-
<i>S. anginosus</i>	+	+	-	-	V	-**	+	-
<i>S. mutans</i>	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>S. salivarius</i>	+	V	-	-	++	+	-	V
<i>S. bovis</i>	+	V	V	-	+	v	-	-

v: variable. \*21-79% de la población positiva. \*\*3% de la población positiva.

Grupo *S. mitis* agrupa las siguientes especies: *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. parasanguinis*, *S. gordonii*, *S. cristatus*, *S. oralis*, *S. infantis*, *S. peroris*, *S. australis*, *S. sinensis*, *S. orisratti*, *S. oligofermentans* y *S. massiliensis*.

Grupo *S. anginosus* agrupa las siguientes especies: *S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*.

Grupo *S. mutans* agrupa las siguientes especies: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. criceti*, *S. rattii* y *S. downei*.

Grupo *S. salivarius* agrupa las siguientes especies: *S. salivarius*, *S. vestibularis* y *S. thermophilus*.

Grupo *S. bovis* agrupa las siguientes especies: *S. equinus*, *S. galloyticus*, *S. infantarius* y *S. alactolyticus*

### 3.1.- Taxonomía

Son numerosos los cambios y actualizaciones realizadas en los últimos años, respecto a la clasificación e identificación de las especies y subespecies de los estreptococos, dentro del complejo *Streptococcus bovis/equinus*. Dentro de este complejo se incluyen actualmente siete especies o subespecies: *S. equinus*, *S. galloyticus* subsp. *galloyticus*, *Streptococcus galloyticus* subsp. *pasteurianus*, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* and *Streptococcus alactolyticus* (Schlegel y cols., 2003). Tradicionalmente, *S. bovis* siempre ha estado más integrado dentro de la literatura médica. Nosotros, por la implicación y repercusión que tiene, nos centraremos principalmente en los aislados de *S. bovis* implicados en patología humana. En la tabla 2 se recogen las principales pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación de los aislados de *S. bovis* en humanos.

Desde siempre, los aislados en humanos de *S. bovis* se han clasificado en función de sus características fenotípicas, distinguiéndose 2 biotipos: biotipo I con fermentación del manitol y biotipo II manitol negativo. La aplicación de técnicas moleculares basadas en la hibridación ADN-ADN y en la secuenciación del gen 16S ARNr originaron numerosos cambios en la clasificación de este complejo (Schlegel y cols., 2003). Cuando se utilizó la secuencia nucleotídica del gen 16S ARNr, el nivel de identidad para todas las especies osciló entre 97,1 y 99,8%, no permitiendo una correcta diferenciación, por lo que se aceptó al gen *sodA* como la mejor diana para identificar estos microorganismos (Poyart y cols., 2002). El gen *sodA* codifica una superóxido dismutasa dependiente de manganeso y presenta un mayor poder de discriminación.

**Tabla 2.-** Pruebas bioquímicas útiles para la identificación de los diferentes aislados de *S. bovis* en humanos.

	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. lutetiensis</i>	<i>S. infantarius</i>
<b>Esculina</b>	+	+	+	v
<b>Manitol</b>	+	-	-	-
<b>Trealosa</b>	+	+	-	-
<b>Rafinosa</b>	+	+	+	v
<b>Melobiosa</b>	-	+	-	+
<b>Glucógeno</b>	+	-	-	+
<b><math>\alpha</math>-galactosidasa</b>	+	+	+	+
<b><math>\beta</math>-galactosidasa</b>	-	+	-	-
<b><math>\beta</math>-glucosidasa</b>	-	+	+	v
<b><math>\beta</math>-glucuronidasa</b>	-	+	-	-
<b><math>\beta</math>-manosidasa</b>	-	+	-	-
<b>Tanasa</b>	+	-	-	-

v: variable.

Como conclusión debemos decir que aunque en la literatura científica los cambios taxonómicos del complejo *S. bovis/equinus* estén aceptados, en la práctica clínica y en lo que se refiere a la patología en humanos, todavía no se han implantado adecuadamente estos cambios y coloquialmente el complejo se sigue dividiendo en los 2 biotipos clásicos: el siempre considerado biotipo I que incluye a *S. gallolyticus*, con 2 subespecies, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*; y el biotipo II que agrupa aislados más heterogéneos y se divide en biotipo II.1, en el que se incluye a *S. infantarius* subsp. *coli* y a *S. lutetiensis* (previamente conocido como *S. infantarius* subsp. *infantarius*), y biotipo II.2, que se corresponde con *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (*S. pasteurianus*) (Poyart y cols., 2002; Schlegel y cols., 2003).

Aún son pocos los trabajos basados en la aplicación del nuevo sistema de identificación de espectrometría de masas MALDI-TOF MS (Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry) para la identificación correcta de los aislados de *S. bovis* (Hinse y cols., 2011; Romero y cols., 2011). Sin embargo, algunos estudios como el de Hinse y colaboradores han conseguido buenos resultados al respecto con una elevada concordancia entre las especies del complejo *S. bovis/equinus* y el gen *sodA*.

### 3.2.- Clínica

En humanos, el cuadro clínico más habitual de *S. bovis* es la bacteriemia/sepsis, acompañada o no de endocarditis (Kupferwasse y cols., 1998). Como se ha mencionado anteriormente, la asociación entre este microorganismo y neoplasias colónicas se conoce desde que McCoy y Mason describieron un caso de bacteriemia/endocarditis por *S. bovis* en un paciente con cáncer de sigma en el año 1951 (McCoy y Mason, 1951). En humanos, la puerta de entrada del microorganismo es habitualmente el aparato digestivo, aunque también son posibles otros focos, como el aparato urinario, el árbol biliar y la orofaringe (Zarkin y cols., 1990). La endocarditis infecciosa (EI) es una enfermedad relativamente poco frecuente, pero con alta morbi/mortalidad asociada. La incidencia anual es de 3 a 10 casos por 100.000 habitantes (Hoen y cols., 2002). Algunos grupos de pacientes muestran una mayor predisposición a desarrollar esta enfermedad, como los afectos de cardiopatías congénitas o de enfermedad reumática valvular, los portadores de prótesis valvulares o los consumidores de drogas por vía parenteral (UDVP). Los avances actuales y el progreso en los métodos de diagnóstico han mejorado el conocimiento de los factores de riesgo, la etiología y la historia natural de esta enfermedad.

**Tabla 3.- Etiología de la endocarditis infecciosa.**

	Porcentaje de pacientes				
	Total	Válvula nativa		Dispositivos intracardiacos	
	n=2781	No UDVP	UDVP	Válvula protésica	Otros dispositivos
<i>Staphylococcus aureus</i>	31	28	68	23	35
SCN	11	9	3	17	26
<i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i>	17	21	10	12	8
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	6	7	1	5	3
Otros estreptococos	6	7	2	5	4
Enterococos	10	11	5	12	6
Grupo HACEK	2	2	0	2	0,5
Hongos/Levaduras	2	1	1	4	1
Polimicrobiana	1	1	3	0,8	0
Cultivo negativo	10	9	5	12	11
Otras bacterias	4	4	3	7	6

HACEK: *Aggregatibacter aphrophilus* (conocido anteriormente como *Haemophilus aphrophilus*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Carsdiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* y *Kingella* spp.; SCN: estafilococos coagulasa negativos; UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral; Otros dispositivos; marcapasos y desfibriladores automáticos implantables.

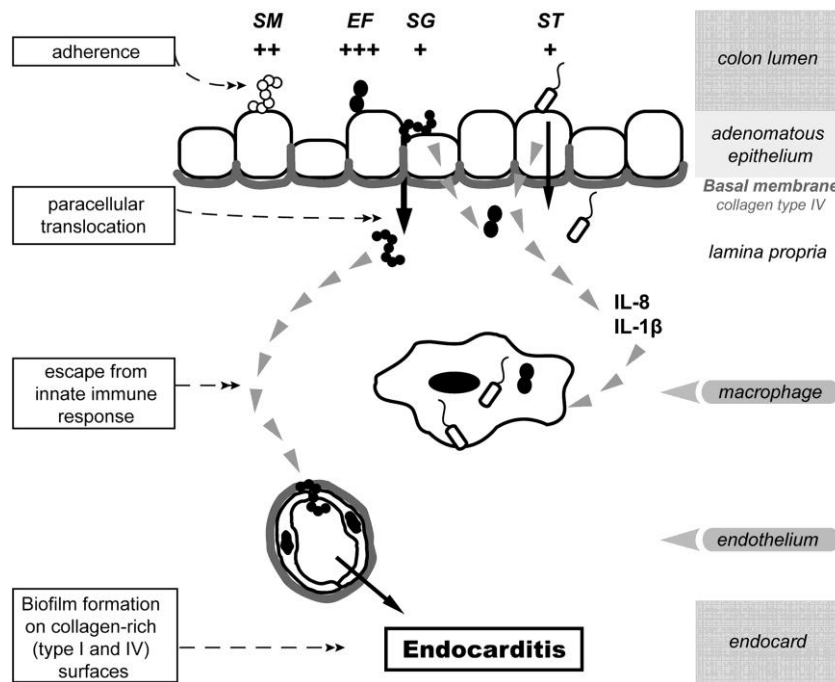


La EI suele producirse en individuos con lesiones previas del endotelio cardíaco que sufren bacteriemias transitorias, generalmente por *Streptococcus* del grupo *viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) o *Enterococcus* spp. (Mylonakis y Calderwood, 2001). Los estreptococos han sido tradicionalmente la causa más frecuente, siendo este patrón clásico en los países en vías de desarrollo. Sin embargo en los últimos años, sobre todo en los países industrializados, los estafilococos han adquirido mayor relevancia, siendo *S. aureus* el microorganismo detectado con más frecuencia en todos los pacientes con EI, incluidos UDVP y los portadores de dispositivos intracardíacos (Murdoch y cols., 2001).

La endocarditis *S. bovis* es una infección relativamente rara. En la mayoría de las series europeas y norteamericanas su frecuencia es variable e inferior al 10% de todas las endocarditis (Murdoch y cols., 2009; Fernández Guerrero, 2002; Moreillon, 2004). Sin embargo, puede alcanzar hasta el 25-50% en los pacientes con bacteriemia (Corredoira y cols., 2005; Hoen y cols., 2005; González-Juanatey y cols., 2006). En zonas del sur de Francia es el principal agente causal de endocarditis, llegando a producir más del 50% de los casos (Hoen y cols., 2005). En España, se ha comunicado algo similar en Galicia, siendo el primer agente productor de endocarditis adquirida en la comunidad con un 24% del total de los casos. Posiblemente pertenecer a un medio rural y el contacto con ganado vacuno podrían explicar las altas tasas de infección en Galicia y Francia (Giannitsioti y cols., 2007).

Otros trabajos publicados posteriormente inciden en la relación entre la colonización/infección de *S. bovis* y el diagnóstico de enfermedades no neoplásicas del tracto digestivo, como las hepatopatías o la enfermedad inflamatoria intestinal (Gold y cols., 2004). Algunos estudios estiman que hasta un 57% de hepatopatías, principalmente cirrosis, se relacionan con bacteriemia por *S. bovis* y/o neoplasias colónicas (Zarkin y cols., 1990). Así pues, debido a su implicación en múltiples procesos patológicos es importante una correcta identificación de *S. bovis* a nivel de subespecie por la existencia de asociaciones subespecie-específica.

La infección por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (biotipo I), especialmente en la endocarditis, presenta una asociación significativa con lesiones malignas y premalignas en el colon. Por ello, numerosos protocolos en el estudio de la EI incluyen la exploración colonoscópica para descartar la presencia de procesos oncológicos (Gupta, 2010). En la figura 7, se puede ver según el modelo propuesto por Boleij y colaboradores, la asociación específica existente entre endocarditis por *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y CCR.



**Figura 7.-** Modelo de asociación de la producción de endocarditis por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y el CCR (Boleij y cols., 2011).

De igual modo, la infección por esta subespecie también se ha vinculado con procesos neoplásicos en otras localizaciones del tracto digestivo (páncreas, vesícula biliar, duodeno, etc.), con enfermedades intestinales no tumorales e incluso con neoplasias extradigestivas, como las hematológicas (Gold, 2004). Las revisiones de trabajos publicados han demostrado una asociación del 71% entre bacteriemia por cepas del biotipo I y presencia oculta de CCR; mientras que la asociación entre bacteriemia causada por cepas del biotipo II con cáncer sólo se ha observado en el 17% de los casos (Abdulmir y cols., 2011). De todas las especies del grupo, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* es la que se detecta más frecuentemente y la única que se ha asociado con el CCR (Burns y cols., 1985).

Varios grupos han estudiado la asociación entre colonización por *S. infantarius* (*S. bovis* biotipo II/1) y *S. pasteurianus* (*S. bovis* biotipo II/2) y las infecciones del tracto biliar (Ruoff y cols., 1989; Sams y cols., 2008; Landau y cols., 2006; Medina y cols., 2011). El porcentaje estimado de bacteriemia por *S. bovis* relacionada con infecciones del tracto biliar puede incluso alcanzar hasta el 38% (Clardrige y cols., 2001; Beck y cols., 2008; Gomez-Garcés y cols., 2012). Una vez más, los factores de riesgo asociados, enfermedades de base de los pacientes y los nuevos cambios taxonómicos sufridos con respecto a *S. bovis*, dificultan conocer el papel determinante de este microorganismo en las infecciones del tracto biliar. Lo que sí está demostrado es que la prevalencia del CCR en pacientes infectados con *S. bovis* biotipo II es significativamente menor que en pacientes infectados con *S. bovis* biotipo I, y ésto no parece aumentar su prevalencia con respecto a la población general (Corredoira y cols., 2013).

Finalmente, también se han descrito casos de *S. bovis* como causa de meningitis (Carnero-Fernández y cols., 2002; Namiduru y cols., 2003), sepsis neonatal (Gavin y cols., 2003), discitis (Matsumura y cols., 2000; Ruiz del Barrio y cols., 2004), abscesos hepáticos (Espeel y cols., 2004), colecistitis (Landau y cols., 2006), artritis (Martín y cols., 2003) y peritonitis (Tanney y cols., 1997). Dependiendo del trabajo, algunos han realizado una correcta identificación a nivel de subespecie sin asociación estadística con las distintas subespecies de *S. bovis*. En animales, se han descrito casos de septicemia en palomas (De Herdt y cols., 1992), brotes en pollos (Chadfield y cols., 2007) o mastitis en el ganado (Garvie y Bramley, 1979).

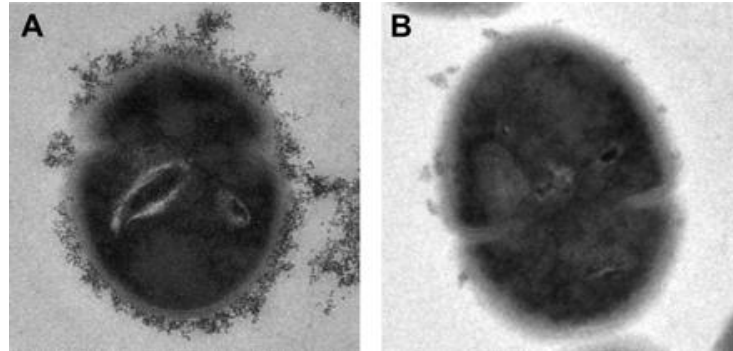
### 3.3.- Epidemiología y patogenia

*S. bovis* forma parte de la microbiota intestinal habitual de algunos animales y de aproximadamente el 10% de los humanos (Noble, 1978; Osawa y cols., 1995). Sin embargo, es causa de mastitis en el ganado (Garvie y Bramley, 1979), septicemia en palomas (De Herdt y cols., 1992), y meningitis, septicemia, y endocarditis en humanos. A pesar del incremento observado en los últimos años, su aislamiento es poco frecuente y se produce mayoritariamente en sujetos mayores de 50 años, con prevalencia similar en hombres y mujeres (Kupferwasse y cols., 1998).

Poco se sabe de la epidemiología y de los factores de virulencia de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, aunque con el desarrollado del sistema de tipado “multilocus sequence typing” (MLST) (Shibata y cols., 2013) y la secuenciación de su genoma, conocemos mejor los factores genéticos implicados en la patogenia y adhesión de este microorganismo al endotelio celular (Hinse y cols., 2011).

Debido a los pocos requerimientos nutricionales que precisa, se adapta bien a los cambios ambientales y es capaz de sobrevivir en condiciones hostiles por su habilidad para degradar gran variedad de polisacáridos complejos como fructosa, lactosa, maltosa... Su característica más importante a destacar es la capacidad para degradar taninos (compuestos polifenólicos tóxicos que se unen a proteínas y otras macromoléculas) que dan lugar a la producción de compuestos fenólicos, como es el ácido gálico, que resulta igualmente muy tóxico (Chamkha y cols., 2002). Su resistencia a los taninos es debida a que posee actividad tanasa, característica que también condujo a que esta bacteria se llamase "*gallolyticus*" (Rusniok y cols., 2010). También se sabe que *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* hidroliza las sales biliares y elude así su efecto inhibitorio, lo que le permite su multiplicación en el intestino (Dussurget y cols., 2002). La presencia de la cápsula extracelular está considerado factor de virulencia ya que media en el proceso de adhesión de la bacteria y en la evasión del sistema inmune. Curiosamente esta bacteria también podría expresar el antígeno humano de Lewis (sLe<sup>x</sup>) que tiene que ver con su habilidad para atravesar el endotelio vascular (Hirota y cols., 1996). Junto con una amplia variedad de polisacáridos presentes en su superficie, se encuentran diferentes proteínas que favorecen la adhesión de la bacteria e hipotéticamente la formación de biofilm o biopelícula (Mandlik y cols., 2008). Todo ello le confiere una gran capacidad de adherencia e invasión de las células endoteliales, imprescindible para el desarrollo de la endocarditis infecciosa (Vollmer y cols., 2010). En la figura 8, se puede observar que a pesar de que *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* están estrechamente

relacionadas, las diferencias existentes a nivel de las estructuras de superficie son amplias, marcando la diferencia entre *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y las demás especies existentes dentro del grupo *S. bovis*.

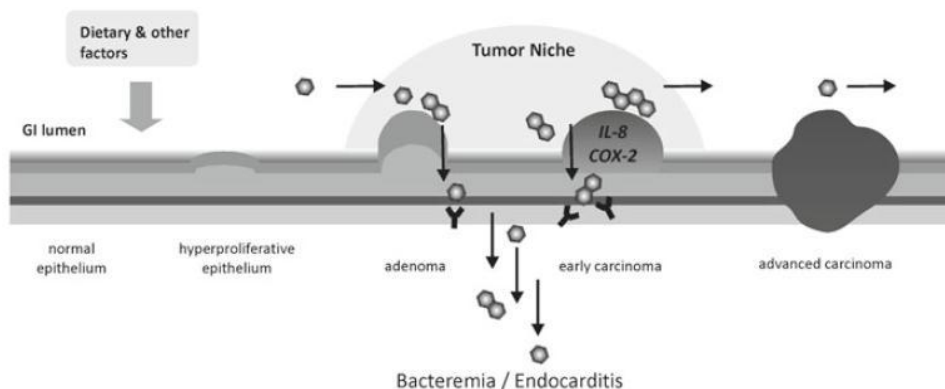


**Figura 8.-** Imagen por microscopía electrónica de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (A) y *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* (B), donde se pueden apreciar las diferencias entre sus estructuras de superficie (Boleij y cols., 2011).

Existe a su vez un conjunto de genes que codifican proteínas relacionadas directamente con una mayor capacidad de colonización (Rusniok y cols., 2010). Por ejemplo, se ha visto que la cepa UCN34 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, codifica cuatro proteínas relacionadas con la unión al colágeno (Gallo0577, Gallo1570, Gallo2032, y Gallo2179). La proteína Gallo2179 presenta un motivo de unión al colágeno, que se encuentra también presente en *S. aureus*, relacionado con una mayor capacidad para causar endocarditis (Hienz y cols., 1998). Los últimos trabajos realizados están tratando de evaluar la respuesta inmunitaria frente a determinadas proteínas relacionadas con los pili de la pared bacteriana de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* para la detección, en las fases tempranas, del CCR (Boleij y cols., 2012). Concretamente se trata de cuatro proteínas llamadas Gallo2179, Gallo2178, Gallo2039 y Gallo1569. Individualmente, Gallo2179 presenta un dominio de unión al colágeno, por lo que está relacionada con la adhesión al colágeno tipo I, la formación de biofilm y una mayor virulencia; y junto a la proteína Gallo2178 está codificada por el operón *pil1*. Gallo1569 y Gallo2039, están codificadas por el operón *pil2* y *pil3* respectivamente. Mientras que el operón *pil2* es una estructura poco conservada, el operón *pil3* puede encontrarse a su vez en especies relacionadas (Rusniok y cols., 2010).

Con respecto al CCR, aún no está claro si la colonización intestinal por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* es la causa o la consecuencia del proceso oncológico. Las alteraciones debidas al CCR o a la presencia de pólipos pueden afectar al flujo del contenido intestinal, provocando la acumulación de materia fecal, que es metabólicamente pobre, pero muy rica en carbohidratos y taninos (O'Donovan y Brooker, 2001). Este ambiente es muy favorable para la proliferación de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y, a su vez, el resto de microorganismos son inhibidos por los polifenoles alimentarios. La proliferación en el lumen intestinal, junto con

la alteración del epitelio de la mucosa, puede favorecer la traslocación de la bacteria y su paso al torrente sanguíneo, provocando posteriormente la endocarditis (Figura 9).



**Figura 9.**-Hipótesis de cómo se produce la proliferación y paso a través del epitelio de la mucosa alterada al torrente sanguíneo de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (Tjalsma y cols., 2012).

A su vez, también se ha postulado que los mecanismos bacterianos implicados en el desarrollo de la oncogénesis estarían relacionados con alteraciones fisiológicas del hospedador, como la inflamación, la linfoproliferación, la inducción de hormonas y la producción de metabolitos tóxicos (Marger, 2006). Ellmerich y colaboradores demostraron en un modelo murino que los antígenos de la pared celular de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* provocan el crecimiento neoplásico en tumores inducidos químicamente (Ellmerich y cols., 2000).

### 3.4.-Sensibilidad antibiótica

Recientemente, la frecuencia de infecciones causadas por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ha aumentado tanto en humanos como en animales (Sekizaki y cols., 2008). Por eso, es importante una adecuada monitorización de los antibióticos para la elección de un adecuado tratamiento en las infecciones causadas por este microorganismo.

En general, todas las especies del complejo *S. bovis* son más sensibles a las penicilinas que otros microorganismos de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* debido a la mayor afinidad de los  $\beta$ -lactámicos por las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) (Williamson y cols., 1983). Por ello se consideran antimicrobianos de elección, tanto en endocarditis como en bacteriemia. No obstante, en este tipo de infecciones graves es recomendable añadir, al menos inicialmente, un aminoglucósido por lo general gentamicina (1 mg/kg cada 8h por vía intravenosa [i.v.] o intramuscular), para obtener una sinergia bactericida. Otros regímenes de tratamiento incluyen la asociación con ceftriaxona o netilmicina.

La daptomicina presenta también una buena actividad frente al complejo *S. bovis*, con valores de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) modales de 0,03 mg/l y siempre  $\leq 0,12$  mg/l (Streit y cols., 2005). Por último, tigeciclina muestra también una buena actividad frente a *S. bovis*, con valores de CMI  $\leq 0,25$  mg/l (Moet y cols., 2007).

Por contra, se han encontrado tasas de resistencias importantes a varios antimicrobianos, como tetraciclinas (78%), macrólidos (59%), clindamicina (50%), estreptomicina y kanamicina (~35%) (Lecquerc y cols., 2005). En nuestro país, también se ha detectado resistencia a eritromicina (45,6%), clindamicina (27,7%) y telitromicina (4%) (Rodríguez-Avial y cols., 2005). En cuanto a las quinolonas, conviene recordar que pueden existir altos niveles de resistencia a las más antiguas, como ciprofloxacino, pero las más recientes, como moxifloxacino, presentan mejor actividad (Hoogkamp-Korstanje y Roelofs-Willemse, 2000).

Recientemente, un estudio compara los perfiles de sensibilidad y la distribución de los genes de resistencia de aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* de orígenes diferentes (Nomoto y cols., 2013). Los aislados procedentes de: pacientes humanos, de septicemia en cerdos, mastitis en vacas, de heces de animales sanos... muestran, en general, unas tasas de resistencia a tetraciclina y doxiciclina mayor en los aislados procedentes de pollos de consumos sanos. Probablemente, esto puede ser debido a los diferentes antibióticos administrados en la cría y cuidado de los animales, así como determinados aditivos y/o suplementos alimentarios.

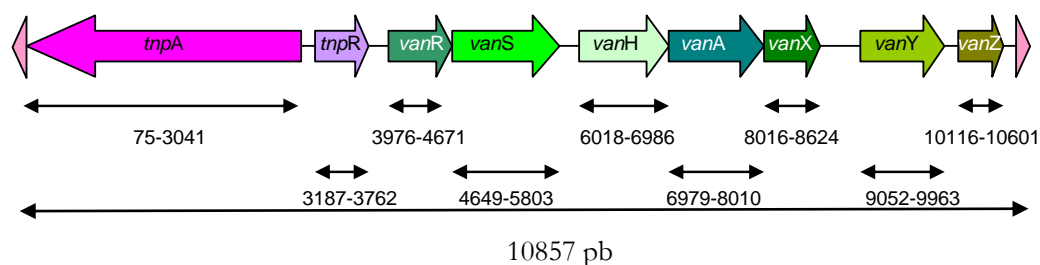
Los aislados de *S. bovis* suelen ser sensibles a rifampicina y a vancomicina. Esta última es una buena opción en pacientes con alergia a  $\beta$ -lactámicos (a dosis de 15 mg/kg/12 h i.v. durante 4 semanas) (Puerto Alonso y cols., 2007). Dado el escaso número de aislados descritos con resistencia a glucopéptidos, la identificación de cepas con estas características requiere una confirmación posterior. Recientemente, se ha detectado resistencia tanto a vancomicina como a teicoplanina en un aislado de un hemocultivo de un paciente ingresado en el Hospital Universitario de Móstoles, en Madrid (Gómez-Garcés y cols., 2012). Hasta la fecha se ha descrito un aislado de *S. bovis* con fenotipo VanB de resistencia a glucopéptidos en las heces de un paciente (Poyart y cols., 1997) y 4 aislados más procedentes de las heces de un ternero, que presentaron tanto el fenotipo VanA como VanB (Mevius y cols., 1998).

La vancomicina y la teicoplanina son antibióticos importantes en el tratamiento de infecciones graves causadas por bacterias grampositivas. Su mecanismo de acción se basa en la unión al precursor del peptidoglucano, el dipéptido terminal D-alanina-D-alanina, inhibiendo la síntesis de la pared celular. Existen diferentes fenotipos producidos por diferentes determinantes genéticos de resistencia (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE y VanG), siendo *vanA* y *vanB* los genotipos más prevalentes en Europa (Werner y cols., 2008). El fenotipo VanA, se caracteriza por presentar resistencia inducible de alto nivel tanto a la vancomicina como a la teicoplanina. Genéticamente este fenotipo se debe a la presencia del transposón Tn1546 o de elementos estrechamente relacionados y fue descrito por primera vez en *Enterococcus faecium* (Arthur y cols., 1993). Tn1546 se localiza generalmente en plásmidos transferibles aunque ocasionalmente puede integrarse también en el cromosoma (Handwerger y Skoble, 1995). Por tanto, el principal mecanismo implicado en la diseminación de la resistencia a glucopéptidos se debe a la transferencia de estos plásmidos conjugativos que vehiculizan el transposón.

El mecanismo de resistencia a glucopéptidos es complejo, interviniendo en él siete genes (*vanA*, *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanX*, *vanY* y *vanZ*) localizados en Tn1546 (figura 10). El gen principal para la resistencia es *vanA*, que codifica una D-alanina-D-lactato ligasa que dará



lugar a un precursor del peptidoglicano con baja afinidad por los glucopéptidos. Para que se produzca la resistencia son necesarias las proteínas VanH y VanX. VanH es una deshidrogenasa necesaria para la síntesis del D-lactato, sustrato necesario para la actividad de VanA; mientras que VanX es una dipeptidasa que hidroliza el dipéptido D-alanina-D-alanina impidiendo, por tanto, su incorporación al peptidoglicano. VanR y VanS, por otro lado, constituyen un sistema regulador de la expresión de *vanA*, *vanH*, y *vanX*, que es activado por la presencia de la vancomicina y la teicoplanina induciendo la expresión del mecanismo de resistencia. Finalmente, VanY y VanZ son proteínas secundarias no esenciales para la resistencia; la primera es una carboxipeptidasa que elimina los residuos de D-alanina terminales que se hayan incorporado ya al peptidoglicano, y la segunda incrementa ligeramente las CMI de teicoplanina<sup>10851 bp</sup> mediante un mecanismo todavía desconocido.



**Figura 10.-** Esquema del elemento genético Tn1546.

El fenotipo VanB se caracteriza por ser una resistencia inducible a vancomicina pero no a la teicoplanina. Se asocia con el transposon Tn1547, de localización generalmente cromosómica aunque en algunos aislados clínicos se ha detectado también en plásmidos transferibles (Rice y cols, 1998). Estructuralmente el operón *vanB* es similar al de *vanA* existiendo un alto porcentaje de homología (aproximadamente, 70%) entre las proteínas VanA, H y X de ambos fenotipos. Por el contrario, las proteínas VanR y VanS (reguladoras) son bastante diferentes, con sólo un 25-30% de homología. El sistema regulador del operón *vanB* no es inducido por la presencia de teicoplanina. No obstante, no es recomendable el uso de la teicoplanina para el tratamiento de las infecciones por enterococos con fenotipo VanB, ya que ha sido documentado, tanto *in vitro* como *in vivo*, el desarrollo de resistencia de alto nivel a este antibiótico, producida por mutaciones localizadas en el sistema regulador.

#### 4.- *Helicobacter pylori*

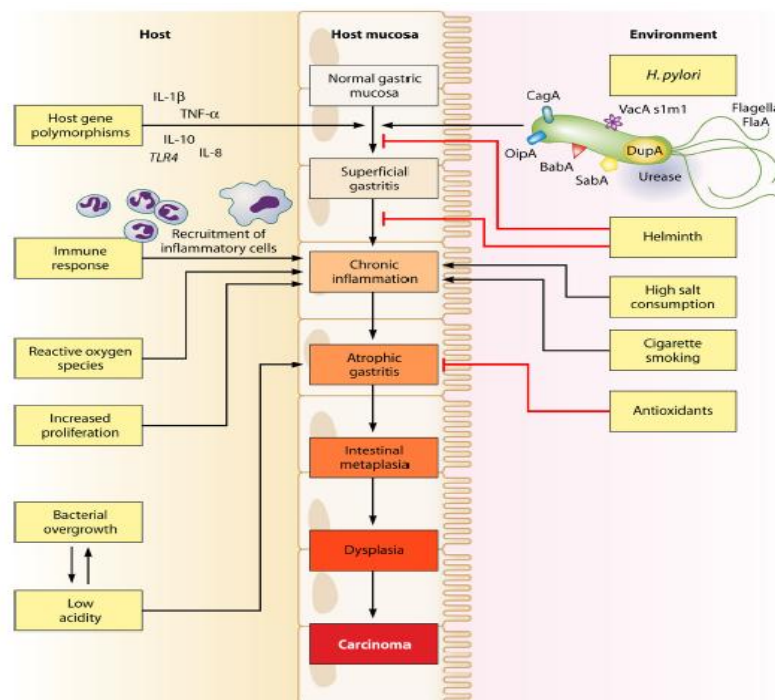
*H. pylori* es una bacteria gramnegativa, ureasa, catalasa y oxidasa positiva que coloniza selectivamente el epitelio gástrico. Presenta morfología espiral, con forma de sacacorchos y posee de 3-5 flagelos con movimiento en forma de hélice que le confieren una gran movilidad.

En 1994, *H. pylori* fue reconocido como carcinógeno tipo I y actualmente es el agente etiológico infeccioso más comúnmente relacionado con el cáncer, representando un 5,5% del

total de la carga global de cáncer (Parkin y cols., 2002). La mayoría de las cepas de *H. pylori* expresan factores de virulencia que les aportan la capacidad de sobrevivir en las condiciones tan hostiles del ambiente gástrico, fundamentalmente por la metabolización de la urea a amonio, vía ureasa, dando lugar a un ambiente neutral que permite el desarrollo de la bacteria (Weeks y cols., 2000).

Aproximadamente el 50% de la población humana está infectada/colonizada por *H. pylori* y la mayoría convive con una inflamación crónica en la mucosa gástrica sin síntomas clínicos (Peek y Blaser, 2002). De las personas infectadas, un 10% desarrolla úlcera péptica, del 1 al 3% llegan a desarrollar cáncer gástrico, y <0,1% desarrolla linfoma tipo MALT (tejido linfoide asociado a mucosa) (Peek y Crabtree, 2006).

La asociación entre *H. pylori* y el cáncer gástrico ha sido tema de debate durante muchos años, demostrándose que la infección incrementa significativamente el riesgo de padecer cáncer gástrico. Esta infección ocurre en todas las regiones del mundo, observándose tasas más altas en los países en vía de desarrollo (Everhart, 2000). La mayoría de las infecciones son adquiridas durante la infancia mediante la vía oral-oral o la vía fecal-oral (Ernst y Gold, 2000), y dependen de factores especie-específicos de la bacteria, de la respuesta del huésped y de factores medioambientales, que en última instancia interactúan entre el patógeno y el hospedador (Blaser y Berg, 2001; Wroblewski y cols., 2012) como se puede apreciar en la figura 11.



**Figura 11.-**Interacción multifactorial que contribuye al desarrollo del cáncer gástrico (Wroblewski y cols., 2012).



Debido a la heterogeneidad que presenta *H. pylori*, los factores de virulencia juegan un papel muy importante en el desarrollo de la infección. La isla de patogenicidad *cag* (*cag* PAI) es una secuencia de DNA de inserción de 40kb que contiene 27 de los 31 genes flanqueados por secuencias repetidas de 31 pares de bases que codifican una de las proteínas más intensamente investigadas de *H. pylori*, CagA (Akopyants y cols., 1998; Censini y cols., 1996). Fue inicialmente identificada en los años 90, y su expresión está fuertemente asociada con el desarrollo de úlcera peptídica (Cover y cols., 1990; Crabtree y cols., 1991). Aunque todas las cepas de *H. pylori* inducen gastritis, las cepas que contienen este elemento aumentan el riesgo de sufrir gastritis atrófica y cáncer gástrico distal (Blaser y cols., 1995; Cover y cols., 1990; Crabtree y cols., 1991; Kuipers y cols., 1995; Parsonnet y cols., 1997). Esta isla de patogenicidad codifica los componentes necesarios para el aparato de secreción tipo IV, el cual tiene como función la expulsión de proteínas de membrana al interior de las células epiteliales gástricas.

Otro de los factores de virulencia relacionado también con un mayor riesgo de sufrir cáncer gástrico es la expresión del gen *vacA*. Este gen codifica para una proteína llamada VacA, citoquina que induce la vacuolización intracelular (Cover y Blaser, cols., 1992; Phadnis y cols., 1994) y encargada de inhibir la respuesta de las células T, contribuyendo a la persistencia de la infección en el individuo (Gebert y cols., 2003). La actividad vacuolizante varía considerablemente de unas cepas a otras, debido principalmente a las variaciones en la estructura del gen *vacA*. Existen además otras proteínas de membrana externa (OMPs) igualmente implicadas con un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Dossunbekova y cols., 2006).

En nuestro país no es posible conocer la situación real y actual de la prevalencia de infección aunque, en cierta medida, el mapa de prevalencia de infección por *H. pylori* parece guardar cierto paralelismo con un patrón de gradiente costa-interior y sur-norte. La mortalidad por cáncer de estómago en España sigue una distribución espacial muy característica, no observada para otros tumores con gran similitud entre sexos y persistencia temporal en las últimas décadas. Estas características, hacen pensar también en una distribución geográfica variable compartida por ambos sexos y con exposición mantenida a otros factores, como son los factores ambientales (Aragón y cols., 2009).

Los factores de virulencia de *H. pylori* son cruciales en la persistencia y desarrollo de la infección, pero también existen otros factores importantes como los ambientales o la dieta (por ejemplo, ingesta de sal) que juegan un papel destacado en el desarrollo del cáncer gástrico. Los factores del hospedador y la duración y persistencia de la infección también son factores a tener en cuenta. La interacción de todos estos factores entre sí determina el desarrollo de la enfermedad cancerígena (Yamaoka, 2010).

En los últimos años también está siendo estudiado el papel de *H. pylori* en la etiología de el CCR. Varios estudios reflejan una relación directa (Meucci y cols., 1997; Mizuno y cols., 2005; Zumkeller y cols., 2006), aunque otros encuentran una asociación negativa (Siddheshwar y cols., 2001; Limburg y cols., 2002; Grahm y cols., 2005). Estos datos tan contradictorios podrían ser debidos a aspectos metodológicos, incluyendo diferencias en las determinaciones de anticuerpos en suero, la realización de colonoscopias incompletas en el

examen diagnóstico de cáncer, limitaciones a la hora de establecer una asociación debido al pequeño tamaño muestral, etc. Los trabajos que se han realizado en este sentido, usando métodos de amplificación, son poco alentadores y escasos. Uno de ellos relaciona la detección de ADN de *H. pylori* en tejido adenocarcinomatoso con un mayor riesgo de CCR (Jones y cols., 2007); otro concluye que el papel de este patógeno no es tan importante en el desarrollo de este cáncer (Bulajic y cols., 2007).

Aunque el escepticismo existente es bastante elevado, otra de las ideas planteadas es que la infección por *H. pylori*, normalmente acompañada por un incremento de la producción de gastrina potente agente mitógeno capaz de inducir la producción de ciclooxygenasa (COX)-2, podría contribuir de manera indirecta al desarrollo de CCR provocando el crecimiento del tumor y una reducción del proceso de apoptosis (Hartwich y cols., 2001).

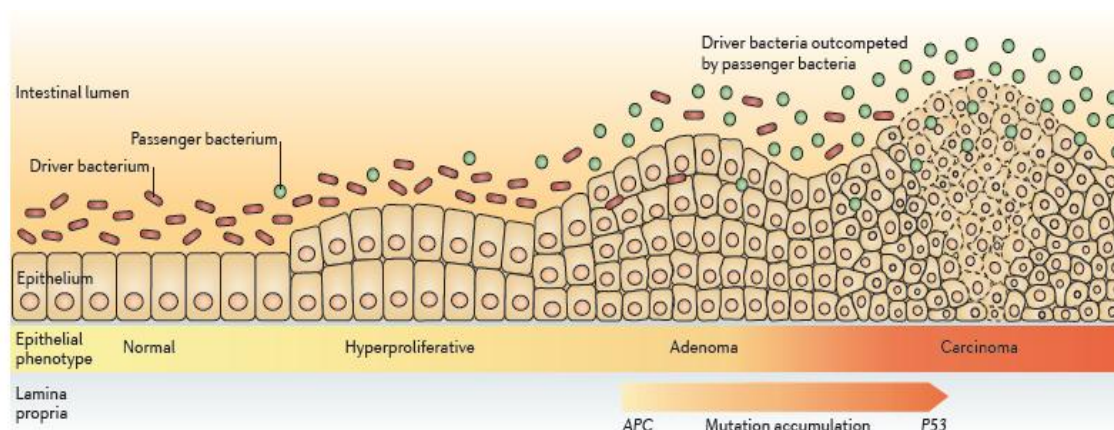
### 5.- *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium

El género *Salmonella* está formado por un grupo muy heterogéneo de bacterias que colonizan el intestino de numerosas especies animales y del hombre. Este género está constituido por bacilos gramnegativos, aerobios o anaerobios facultativos, móviles por poseer flagelos peritricos, que fermentan la glucosa, la maltosa y el manitol, pero no la lactosa. Según la clasificación actual, el género *Salmonella* consta de 2 especies reconocidas: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. A su vez, *S. enterica* se divide en 6 subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *boutanae* (IV) e *indica* (VI) (Tindall y cols., 2005). Las salmonellas de la subespecie I se aíslan principalmente en el hombre, en animales de sangre caliente y en aves, mientras que las pertenecientes a otras subespecies se encuentran más frecuentemente en animales de sangre fría y en el medioambiente (Lan y cols., 2009). La serotipificación es el primer método utilizado en el estudio de la epidemiología de esta bacteria (Grimont y Weill, 2007), basado en la caracterización de los antígenos somáticos “O” de la pared bacteriana, de los antígenos flagelares “H” y, en algunos casos como en el serotipo Typhi, del antígeno capsular de virulencia “Vi”. La mayoría son móviles por medio de 2 tipos diferentes de flagelos, denominados de fase 1 y de fase 2, cuyas flagelinas vienen expresadas por los genes *fljC* y *fljB*, respectivamente. Typhimurium y Enteritidis son los serotipos que con más frecuencia infectan al hombre (Centers for Disease Control and Prevention, 2004).

*Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*) es un importante patógeno en humanos causante de gastroenteritis autolimitada, caracterizada por fiebre, inflamación intestinal, diarrea y la presencia de neutrófilos en heces (Harris y cols., 1972).

Recientemente se ha señalado que el acceso de *S. Typhimurium* a determinados nutrientes contribuye a una mayor virulencia (Rohmer y cols., 2011). Los últimos trabajos realizados evidencian que incluso *S. Typhimurium* podría tener cierta relación con el CCR (Kato y cols., 2013) especialmente cuando existen concentraciones elevadas de hierro y con el consumo de tabaco. El hierro es un elemento imprescindible para el crecimiento bacteriano, pero también para el adecuado funcionamiento de determinados procesos metabólicos como es la actividad de las enzimas peroxidadas (Messenger y Barclay, 1983). Este tropismo bacteriano por el hierro, podría inducir una respuesta inflamatoria en el tejido epitelial del hospedador,

la cual unido a la existencia de lesiones en la mucosa colónica previas, podría contribuir al desarrollo del cáncer. De hecho, niveles estadísticamente significativos de anticuerpos frente al biomarcador por colonización de *S. Typhimurium*, flagelinas (FliC), han sido detectados en estadios tempranos de pacientes con cáncer (Kato y cols., 2013). Éste se trata del primer estudio serológico donde se establece un mayor riesgo de padecer cáncer colorrectal en personas que presentan títulos elevados de anticuerpos frente a *S. Typhimurium*. Además, en uno de los últimos trabajos publicados relacionados con el cáncer colorrectal, se plantea la idea de que *Salmonella* spp. podría jugar un papel importante en los estadios iniciales del cáncer (bacterias denominadas “drivers”), causando inflamación, aumento de la proliferación celular y producción de sustancias capaces de dañar el ADN de la mucosa epitelial. Estas alteraciones en la mucosa colónica dan lugar a la generación de un nuevo microambiente en el que se ve favorecido el sobrecrecimiento de nuevas bacterias (“passengers”, como *Fusobacterium* o *Streptococcus* spp.) (Tjalsma y cols., 2012).



**Figura 12.-** Modelo propuesto para el cáncer colorrectal “A bacterial driver-passenger model” (Tjalsma y cols., 2012).

## 6.-Proyecto MCC-Spain

A finales del año 2007 se firmó un convenio de colaboración entre el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y el CIBERESP (Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública) para el desarrollo de la Acción Transversal del Cáncer aprobada mediante acuerdo del Consejo de Ministros del 11 de Octubre de 2007. Esta acción transversal está liderada por el Centro Nacional de Epidemiología, específicamente el Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer, y tiene tres líneas principales de estudio: la monitorización de la situación del cáncer en España (línea en la cual son referencia nacional), la epidemiología ambiental, ocupacional y estilos de vida; y la epidemiología genética y molecular del cáncer.

En 2008, CIBERESP pone en marcha un estudio multicaso-control (MCC-SPAIN, <http://mccspain.org>) para investigar la influencia de factores ambientales y su interacción con factores genéticos en tumores muy frecuentes o con características epidemiológicas

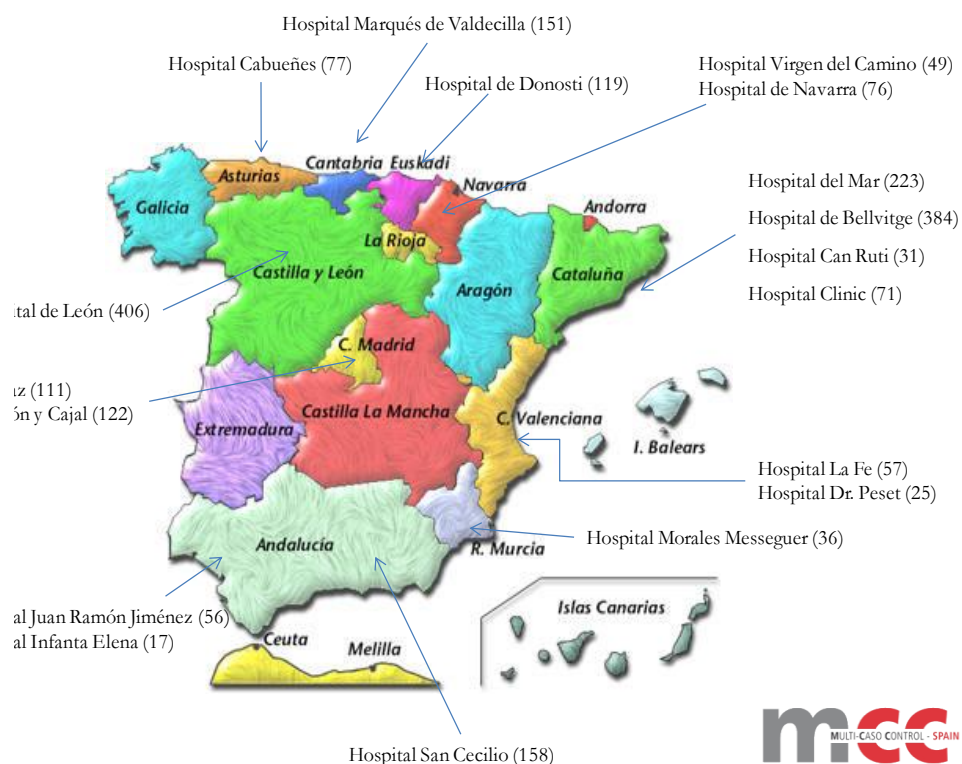
peculiares en nuestro país, en las que los factores ambientales implicados no son suficientemente conocidos.

MCC-SPAIN cuenta con los siguientes elementos clave:

- selección de controles poblacionales;
- toma de muestras biológicas en casos y controles para la medición de exposiciones ambientales;
- constitución de un banco de ADN para incorporar a las iniciativas internacionales de exploración del genoma (genome-wide association studies),
- inclusión de muestras tumorales para la subclasificación molecular.

Los tumores inicialmente elegidos para el estudio en la Acción Estratégica 2008 fueron el CCR y el cáncer de mama y posteriormente se sumaron el cáncer gastroesofágico y el de próstata. Se reclutaron también casos para el estudio de leucemia linfática crónica y linfoma linfocítico pequeño (LLC/LLP). El CCR fue incluido debido principalmente a su elevada frecuencia y su particular distribución geográfica.

En el marco de MCC-SPAIN se han recogido un total de 2169 casos de CCR con sus controles apareados en sexo y edad. La distribución geográfica de los casos y controles se muestra a continuación en la figura 13.



**Figura 13.-** Mapa geográfico de la recogida de muestras en España.

## 7.-Serología relacionada con infecciones asociadas a cáncer

La serología analiza los anticuerpos circulantes acumulados en sangre, suero o plasma producidos frente a una infección o frente a proteínas extrañas o de origen desconocido para el huésped. Los estudios serológicos ofrecen la posibilidad de analizar la respuesta de anticuerpos frente a cualquier agente infeccioso y también los posibles factores de riesgo asociados. Los estudios de casos-controles son estudios observacionales retrospectivos que incluyen un grupo de pacientes con una misma enfermedad y otro grupo control parejo en edad, sexo y distribución geográfica. En ambos grupos se recogen por igual todos los datos clínicos, a la vez que se realizan encuestas acerca de su estilo de vida y hábitos alimentarios. Sin embargo, sólo es posible estimar el riesgo de desarrollar dicha enfermedad relacionada a la exposición, presentando el “odds ratio” de la exposición en los casos frente al “odds ratio” de la exposición en los controles. Otro estudio que puede plantearse, se basa en el seguimiento prospectivo de una cohorte de individuos expuestos frente a determinados factores de riesgo. El seguimiento en el tiempo de esos individuos permite conocer el desarrollo y la evolución de la enfermedad. El riesgo de desarrollar la enfermedad de los expuestos frente a los no expuestos, puede ser comparado como el riesgo relativo de desarrollar la enfermedad frente a los factores de riesgo elegidos en el estudio en la población a estudiar (dos Santos, 1999).

Predecir el riesgo de desarrollar cáncer mediante la detección de la exposición a un determinado microorganismo es complicado, ya que aunque algunos están considerados como potencialmente carcinogénicos no significa que el cáncer llegue a desarrollarse. Sin embargo, la producción de anticuerpos frente a algunos agentes infecciosos que se expresan durante el desarrollo de cáncer, pueden ser considerados como posibles marcadores serológicos. Ejemplos de ello bien conocidos son las proteínas E7y E6 del virus del papiloma humano y las proteínas CagA y VacA de *H. pylori*. La producción de anticuerpos frente a estos antígenos está fuertemente asociada al cáncer cervical (Meschede y cols., 1998) y el cáncer gástrico (Gao y cols., 2009), respectivamente, y es por ello que la detección de estos antígenos es una herramienta verdaderamente útil para predecir un mayor riesgo de cáncer.

### 7.1.-Ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA)

El ensayo de inmunoabsorción enzimática (enzyme-linked immunosorbent assay o ELISA) es una técnica comúnmente usada en los estudios serológicos. Está basada en la lisis de la pared celular de bacterias, partículas de virus purificadas..., acoplado a un soporte sólido, como los pocillos de una placa microtiter de plástico, donde los correspondientes anticuerpos se unirán convenientemente. Se puede usar tanto un antígeno purificado como el recombinante.

La unión del anticuerpo al antígeno se realiza en condiciones que bloquean la adsorción no específica para a continuación eliminar, mediante una serie de lavados, los anticuerpos no unidos. La unión se detecta por una reacción enzimática que convierte un sustrato incoloro en un producto coloreado. El cambio de color puede evaluarse visualmente en la placa microtiter, lo cual facilita en gran medida la recogida de datos. Para detectar la unión de



anticuerpos al antígeno adsorbido en los pocillos, se utilizan anticuerpos anti-inmunoglobulina marcados (Conroy y cols., 1994).

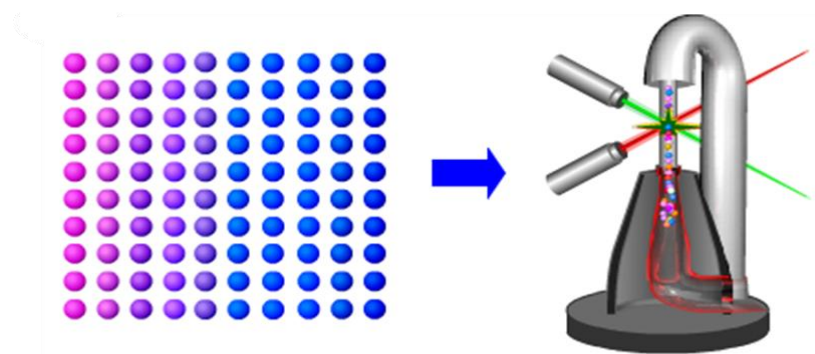
En este método sólo se produce la determinación de un único antígeno por pocillo, lo que imposibilita la detección de infecciones causadas por múltiples antígenos y limita la realización de estudios serológicos debido al excesivo tiempo y material requerido.

## 7.2.-Serología Múltiple

Basada en la nueva tecnología xMAP de Luminex, esta técnica se fundamenta en la combinación de distintos conceptos tecnológicos de probada solvencia como la citometría de flujo, el uso de microesferas, el procesamiento digital de las señales y la química tradicional que permiten la realización de una gran variedad de bioensayos de una manera rápida, sensible y eficaz.

La citometría de flujo es una técnica en la que se miden simultáneamente múltiples parámetros de una célula o partícula (previamente marcadas con fluorocromos) en suspensión dentro de una población heterogénea. Para ello se hacen pasar dichas células, a velocidad constante, a través de una cámara de flujo sobre la que incide un haz de luz a una longitud de onda determinada. Como consecuencia del impacto, se produce una dispersión de luz policromática generada por los diferentes fluorocromos, que es captada por diversos detectores de gran sensibilidad. Los datos generados se analizan estadísticamente mediante softwares específicos que nos dan gran información acerca de sus características intrínsecas y/o extrínsecas, así como estructurales y/o funcionales de las células. La citometría de flujo tiene diversas aplicaciones, como por ejemplo el inmuno-fenotipado, la muerte celular, el conteo celular, la expresión de genes,...

La tecnología xMAP implica un proceso que marca internamente con dos fluorocromos distintos una serie de microesferas de poliestireno. Usando unas proporciones precisas de ambos fluorocromos, podemos obtener hasta 100 grupos de microesferas distintas, cada una con su patrón único de color, identificable por láser.

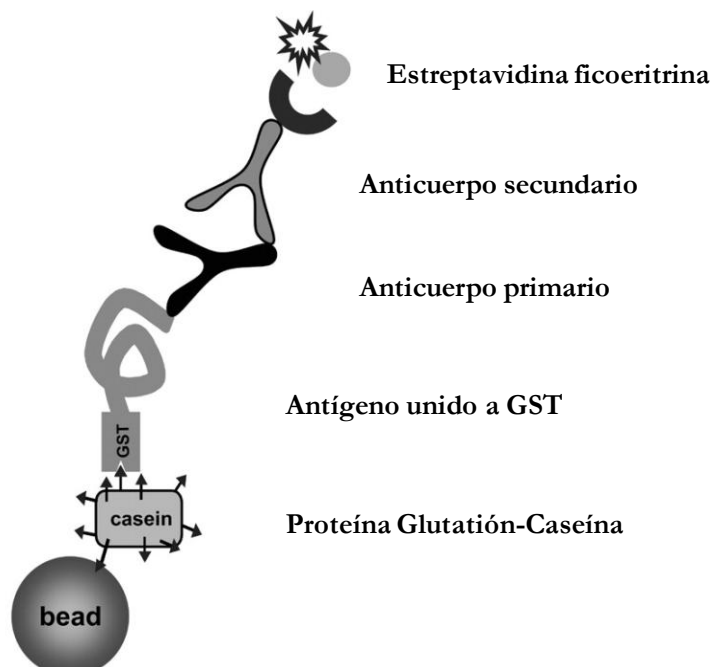


**Figura 14.-** Representación esquemática del proceso de lectura de las microesferas empleadas por el Sistema xMAP de Luminex.

Cada microesfera se conjuga a cada uno de los reactivos específicos utilizados en el bioensayo en cuestión, y posteriormente el analizador automático Luminex identifica, por un lado a cada microesfera usada (por lo que de esta manera sabríamos con que reactivo estamos trabajando), y por otro lado si existe o no fluorescencia asociada (en el caso de que se produzca la unión específica al anticuerpo). La combinación de los distintos tipos de microesferas en un único pocillo nos permite analizar hasta 100 parámetros simultáneamente en una misma muestra de forma rápida, precisa y con pequeños volúmenes de muestra. Es importante proteger estas microesferas de poliestirenos de la luz y de elevadas temperaturas por la inestabilidad que presentan (Luminex 100™ User Manual Version 1.7, 2004).

Las microesferas (SeroMap, Luminex) empleadas están especialmente formuladas para reducir las uniones inespecíficas durante el estudio serológico, ya que contienen en su superficie grupos carboxilos (-COOH) que permiten una unión covalente a los determinados ligandos (o biomoléculas).

Más concretamente, el método desarrollado para la realización de la Serología Múltiple para estudios serológicos, se basa en la combinación del ensayo de inmunoabsorbancia marcada con Glutación S-transferasa (GST) con la tecnología xMAP de Luminex (Waterbour y cols., 2005). De esta forma, las proteínas de fusión recombinantes son usadas como antígenos y una vez purificadas se acoplan a las distintas microesferas de poliestireno unidas previamente a glutación-caseína (GC-microesferas de poliestireno) (Michael y cols., 2009).



**Figura 15.**-Esquema serología múltiple para la determinación de anticuerpos (modificado del protocolo descrito por Waterboer y cols., 2005).

Sin embargo, tanto el desarrollo como la validación de la técnica de fusión de proteínas marcadas con glutatión-caseína son costosos y requieren tiempo y personal cualificado, especialmente cuando se trata de una bacteria que presenta una gran variedad de proteínas inmunogénicas. Para una primera aproximación de la reactividad de los anticuerpos y análisis sobre la posible asociación de la infección bacteriana con el cáncer, resulta más práctico trabajar con una mezcla de antígenos de dicha bacteria, como por ejemplo un extracto de las proteínas de la membrana procedente de un cultivo bacteriano. Así, la posibilidad de unir directamente dichas proteínas a las microesferas podría ser usado como una alternativa más sencilla y menos costosa. Esto se debe fundamentalmente a la presencia de grupos carboxilos (-COOH) en su superficie que permiten uniones covalentes.

## **8.- Nuevas herramientas de identificación bacteriana**

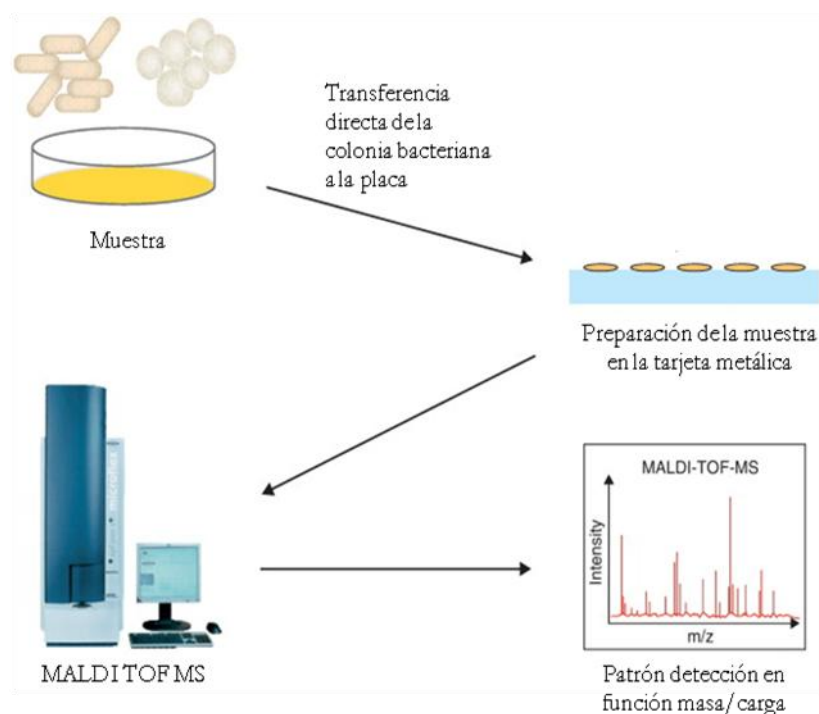
### **8.1.- Identificación bacteriana mediante MALDI-TOF MS**

Esta técnica recibe este nombre por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (Hillenkamp y Karas, 1990). El concepto es bastante simple: cuando los iones de diferente masa y carga son expuestos a un campo eléctrico, esto les permite recorrer un espacio de una longitud dada en un tiempo determinado que depende de su masa y de su carga.

Para ello, se mezcla la muestra con una matriz para conseguir su cristalización dentro de ella. Posteriormente, la muestra cristalizada es introducida dentro de un espectrómetro de masas, donde se bombardea con un láser UV. La matriz absorbe la energía del láser y la muestra se vaporiza, liberando iones de varios tamaños. Estos iones se aceleran cuando atraviesan un campo magnético y viajan a través de un tubo de vuelo. Los iones más pequeños viajan más rápido que los grandes. Cuando los iones alcanzan el final del tubo de vuelo inciden en un detector. El tiempo de vuelo requerido para alcanzar el detector es utilizado para calcular la masa de los iones. La información recogida, después de que los iones alcancen el detector, es utilizada para crear un espectro de masas, en el que se obtiene información, no solo de la masa y la carga de los iones, sino también del número de iones de un tamaño determinado que alcanzó el detector (Giebel y cols., 2010).

La tecnología del MALDI-TOF MS se utiliza para la identificación de microorganismos fundamentalmente porque las células intactas se utilizan para generar un único espectro que es conocido como la huella digital del microorganismo, el cual se compara con las huellas digitales recogidas previamente en una base de datos.



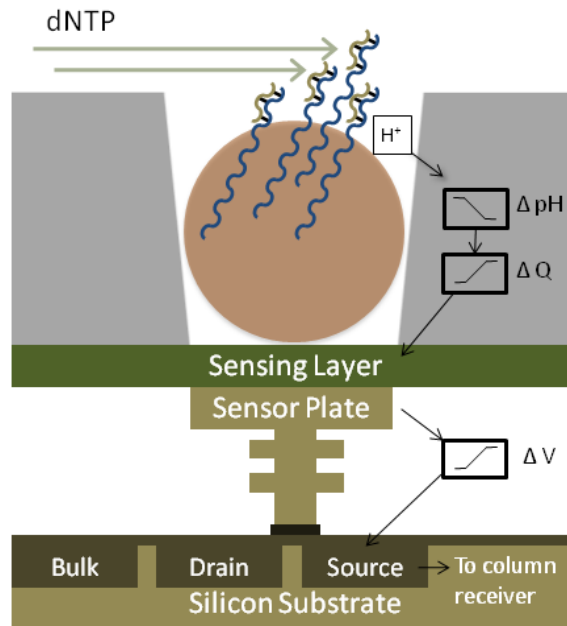


**Figura 16.-** Esquema de trabajo de MALDI-TOF MS (Bruker, Alemania).

## 8.2.- Secuenciación de genomas bacterianos

El continuo desarrollo de las plataformas de secuenciación de nueva generación ha dado lugar a un incremento vertiginoso en la cantidad de datos genómicos generados. A diferencia de los sistemas de secuenciación tradicionales, estas plataformas son capaces de generar paralelamente, y de forma masiva, millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación y en un tiempo récord. Debido a su gran rendimiento, este tipo de plataformas son idóneas para abordar estudios a gran escala como la secuenciación de genomas bacterianos completos (Liu y cols., 2012).

El sistema de pirosecuenciación Ion Torrent aprovecha el poder de la tecnología de semiconductores para detectar los nucleótidos que se incorporan durante la síntesis *de novo* de ADN mediante la liberación de protones (Rothberg y cols., 2011). La pieza fundamental de Ion Torrent es un chip semiconductor capaz de medir cambios de pH. Cuando un nucleótido se incorpora por la polimerasa a la nueva hebra de ADN, se libera un protón provocando un cambio de pH. El dispositivo va liberando secuencialmente la información de cada nucleótido y no necesita ningún sistema óptico complementario, por lo que el tiempo de lectura es corto (<http://ioncommunity.lifetechnologies.com/>).



**Figura 17.-** Esquema de un pocillo del chip del sistema de secuenciación Ion Torrent. Cuando se incorpora un nucleótido, se libera un  $\text{H}^+$  produciéndose un cambio de pH (<http://ioncommunity.lifetechnologies.com//>).



---

# Objetivos

---

“El objetivo es  
importante, pero no tanto  
como el camino hacia él”

---

Buda

---



## II. OBJETIVOS

Tras lo expuesto en la sección anterior, se hace necesario profundizar en la relación existente entre *S. bovis* y el CCR. La nueva tecnología Luminex permite la determinación serológica de anticuerpos específicos de numerosos microorganismos, aunque por el momento aún no ha sido optimizada para el estudio de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Por otro lado, la plataforma MCC-Spain cuenta con una gran colección de sueros de pacientes con CCR (casos) y sujetos sanos (controles) recogidos por toda la geografía española.

Los avances en la clasificación de *S. bovis* justifican la necesidad de una adecuada identificación en los aislamientos clínicos, que muchas veces requiere la utilización de técnicas moleculares de secuenciación.

Así pues, los objetivos de esta tesis fueron:

- 1) Poner a punto un esquema de trabajo basado en la tecnología Luminex para estudios serológicos con proteínas específicas de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.
- 2) Conocer la respuesta inmunitaria frente a *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* en pacientes con CCR y población sana española.
- 3) Analizar la respuesta inmunológica frente a otros patógenos como *H. pylori* y *S. Typhimurium* en pacientes con CCR y población sana española, comparándola a su vez con la de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.
- 4) Reclasificar, de acuerdo a la actual clasificación taxonómica, los aislados clínicos de *S. bovis* identificados en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal durante el periodo 2003 al 2010.
- 5) Analizar las asociaciones entre el diagnóstico clínico y las diferentes subespecies de *S. bovis* según la nueva clasificación taxonómica.
- 6) Estudiar la diversidad genética y la sensibilidad a los antibióticos de una colección de aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* de procedencia humana en comparación con otra colección de origen animal.



---

# Material y Métodos

---

“La verdadera grandeza de la  
ciencia acaba valorándose por  
su utilidad”

---

Gregorio Marañón

---





### III.- MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1.-Estudio serológico

Se seleccionaron 1.512 sueros del estudio MCC-Spain, 582 procedentes de pacientes con CCR con sus 582 controles sanos pareados en edad, sexo y localización geográfica. Como ya se ha comentado anteriormente, MCC-Spain es un proyecto epidemiológico plenamente orientado en el campo de la Salud Pública, planteado para aumentar el conocimiento de los tumores más comunes que afectan a la población española. Cuenta con una elevada representatividad en todo el territorio nacional, ya que se ha recogido información de un total de 19 hospitales en 11 Comunidades Autónomas españolas (Cataluña, Madrid, Navarra, País Vasco, Asturias, Murcia, Huelva, Valencia, Granada, Cantabria y Castilla-León).

#### 1.1.-Ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA)

##### 1.1.1.- Selección de sueros

Se seleccionaron 1.164 sueros dentro de la colección disponible para realizar la detección de *H. pylori* mediante la técnica de ELISA.

##### 1.1.2.- Desarrollo de la técnica

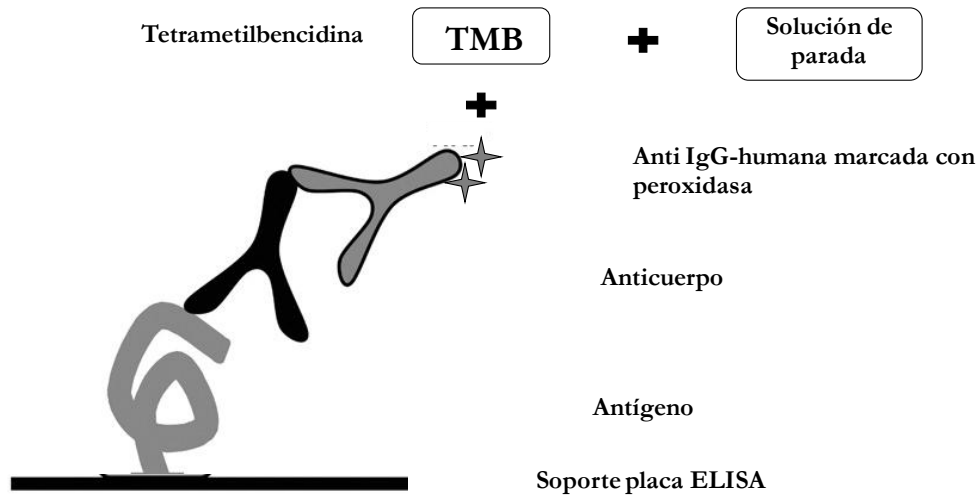
Todas las muestras de suero fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento y se realizó un proceso de descongelación lento a 4°C durante el día anterior a la realización de la serología. La determinación de anticuerpos frente a la inmunoglobulina G (IgG) de *H. pylori* fue realizada mediante el ensayo por ELISA, usando el kit comercial *Helicobacter pylori* IgG ELISA (RE 56831, IBL International GMBH, D-22335 Hamburg, Germany). Para llevar a cabo el análisis cualitativo, se partió de una dilución 1:100 del suero recogido en la solución de disolución, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como paso inicial, se añadieron 100 µl de cada estándar y de cada muestra diluida en los pocillos. Después de cubrir la placa con un papel adhesivo transparente, la placa se incubó durante 60 minutos a 18-25°C.

El siguiente paso, fue descartar la solución de incubación para proceder al lavado de la placa. La placa se lavó 3 veces con 300 µl de solución de lavado diluida previamente en agua destilada. El exceso de solución se retiró golpeando cuidadosamente la placa invertida sobre una toalla de papel.

Posteriormente, se añadieron 100 µl de enzima conjugada (anti IgG-humana marcada con peroxidasa) en cada pocillo, y después de cubrir la placa con el papel adhesivo, se incubó durante 30 minutos a 18-25°C. Transcurrido este tiempo, se realizaron de nuevo 3 lavados, de la misma forma descrita anteriormente, y acto seguido se añadió 100 µl de solución sustrato TMB (tetrametilbencidina) en cada pocillo (para este paso, se utilizó la pipeta multicanal, ya que la adición de sustrato y solución de parada debe realizarse en intervalos de tiempos iguales, evitando la formación de burbujas). Este último paso, sólo contó con una incubación de 20 minutos de duración a 18-25°C en la oscuridad, sin la necesidad de cubrir la placa.

Pasado este tiempo, se detuvo la reacción añadiendo 100 µl de solución de parada (ácido sulfúrico) en cada pocillo. Para mezclar bien la solución de parada con la solución sustrato se agitó suavemente la placa. Se midió la densidad óptica a 450 nm en el espectrofotómetro (Micro plate Reader MR-96A, Mindray) en los 60 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.



**Figura 18.-**Esquema del ensayo ELISA.

La interpretación cualitativa de los resultados (basados en el índice de corte, COI) se corresponde con: <0,8 negativo; 0,8-1,2 dudoso y >1,2 positivo.

## 1.2.-Serología Múltiple

Esta nueva herramienta serológica basada en la tecnología de matriz de suspensión (xMAP de Luminex Corporation) permite la detección de anticuerpos frente a *H. pylori*, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y *S. Typhimurium* de forma conjunta, así como su análisis para el estudio de la asociación existente entre estas tres especies bacterianas con CCR. Este estudio serológico de casos y controles se realizó en el laboratorio y bajo la supervisión de Dr. Michael Pawlita, Dr. Angelika Michel y Dr. Martina Willhauck-Fleckenstein en German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg. El grupo de Harold Tjalsma en la Radboud University Medical Center, Nijmegen, Holanda facilitó la proteína purificada FliC de *S. Typhimurium* y las proteínas purificadas de los pilis llamadas Gallo1569, Gallo2039, Gallo2178 y Gallo2179 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.

### 1.2.1.- Selección de sueros

El análisis se realizó en los 1.512 sueros procedentes del estudio MCC-Spain (582 casos con sus 582 controles pareados). Además también se contó, como controles negativos y positivos, con

sueros de referencia de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y de *S. Typhimurium* (Boleij y cols., 2012), y con una placa control, con sueros control positivos para *H. pylori* e inmunoglobulinas humanas, preparadas por el laboratorio de Dr. M. Pawlita del DKFZ (Privigen®; CSL Behring, Marburg). Las proteínas procedentes de la cápsula (VP1) del polyomavirus BK, JC y HPyV6 fueron incluidas en el análisis también como controles específicos. Tras varios ensayos, se determinó trabajar con una dilución final de los sueros de 1:500.

### 1.2.2.- Preparación y selección de las cepas bacterianas y proteínas purificadas utilizadas para el estudio

Se contó con cepas de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. pasteurianus* y *S. lutetiensis*, aisladas de pacientes con bacteriemia, cedidas por el Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal. A su vez W. Nicklas del Laboratorio de Microbiología del DKFZ, proporcionó la cepa *H. pylori* 185-44. Como ya se ha mencionado anteriormente, para una primera exploración de la reactividad de los anticuerpos, resulta más práctico y útil trabajar con una mezcla de antígenos de la bacteria procedente de un cultivo bacteriano ya que es posible su unión directa a las microesferas. Para las proteínas purificadas FliC de *S. Typhimurium* y las proteínas de los pilis Gallo1569, Gallo2039, Gallo2178 y Gallo2179 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, se procedió de igual forma, mediante unión directa de las proteínas a las microesferas. Por otra parte, las proteínas recombinantes de *H. pylori* marcadas con Glutación S-transferasa (GST-tag fusion proteins), fueron preparadas en el DKFZ.

### 1.2.3.- Unión extracto proteínas de la membrana procedente de un cultivo bacteriano o proteínas recombinantes a las microesferas

Se siguió el protocolo descrito por Waterboer y cols., 2005.

#### 1.2.3.1.- Unión de las proteínas directamente a las microesferas

Para la unión directa del extracto de proteínas de *H. pylori*, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. pasteurianus* y *S. lutetiensis* (procedente del cultivo bacteriano), y de las proteínas purificadas FliC de *S. Typhimurium* y las proteínas de los pili llamadas Gallo1569, Gallo2039, Gallo2178 y Gallo2179 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* a las microesferas fluorescentes de poliestireno, el primer paso fue la activación de las microesferas. Se partió de  $1,25 \times 10^7$  microesferas que se lavaron 2 veces con 400 µl de solución de activación y centrifugadas durante 2 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente, el pellet resultante fue resuspendido en 400 µl de solución de activación, añadiéndose finalmente EDC (1-Ethyl-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) (50 mg/ml en solución de activación) y NHS (N-hidroxisuccinimida) (50 mg/ml in DMSO). La suspensión final se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, en continua agitación y protegida de la luz. El último paso fue el lavado de las microesferas con 1 ml de solución de bloqueo (2 veces), para después resuspender las microesferas en 1 ml de solución de unión.

Una vez activadas, las microesferas fueron incubadas conjuntamente con el extracto de proteínas durante 2 horas a temperatura ambiente, en agitación continua y protegidas de la luz. Se realizaron 3 lavados seguidos: el primero con 1 ml de solución de lavado e incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente, en agitación continua y protegidas de la luz; los otros dos

lavados se realizaron con la solución de lavado 2. Una vez eliminada completamente esta solución, las microesferas se resuspendieron en 250 µl de la solución de almacenamiento. Por último, se guardaron a 4 °C protegidas de la luz hasta su posterior utilización. Para el análisis de un suero la cantidad de microesferas necesarias fue de 3.000/antígeno.

#### 1.2.3.2.- Unión proteínas a las microesferas, previamente unidas a glutatión-caseína (GT-microesferas)

Para la realización de la serología múltiple de *H. pylori*, basada en la combinación del ensayo de inmunoabsorbancia marcada con Glutatión S-transferasa (GST) con la tecnología xMAP de Luminex, se evaluó la respuesta inmunológica frente a 15 proteínas específicas de *H. pylori* (Urea, Catalasa, GroEL, NapA, CagA, CAgM, CagI, HP0231, VacA, HpaA, Cad HyuA, Omp, HcpC, y HP0305) previamente comprobadas y validadas en trabajos anteriores (Michael y cols., 2009; Waterboer y cols., 2005).

Las proteínas recombinantes obtenidas fueron diluidas a una concentración de 1 mg/ml de proteína total en la solución de bloqueo, en un volumen total de 1 ml. Posteriormente, se mezclaron vigorosamente y se incubaron con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad con las microesferas fluorescentes de poliestireno pretratadas previamente con glutatión-caseína (3.000 por antígeno/pocillo). Acto seguido, las microesferas fueron lavadas tres veces con 1 ml de solución de bloqueo y centrifugadas durante 2 minutos a 13.000 rpm. Finalmente, se guardaron en la solución de almacenamiento durante toda la noche a 4 °C protegidas de la luz.

#### 1.2.4.- Luminex

El protocolo seguido fue:

1. Antes de empezar con el proceso, se incubaron placas con 100 µl de solución de bloqueo/pocillo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para la eliminación de dicha solución y el secado de las placas, se utilizó una bomba de vacío. Con un martillo especial para este procedimiento se procedió a dar unos golpes suaves para eliminar totalmente la solución. Este proceso se repitió de 2-3 veces.
2. Para la obtención de una suspensión homogénea de las microesferas unidas a los diferentes antígenos, fue necesario el sonicado y la utilización simultánea del vortex. Después de este paso, se añadieron 50 µl de esta suspensión en las placas, previamente preparadas, junto con otros 50 µl del suero preincubado (con este nuevo paso, la dilución final del suero fue 1:100). Posteriormente, las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad a 200 rpm y en continua agitación.

Una de las principales limitaciones de esta técnica, es que los sueros pueden dar lugar a uniones inespecíficas y falsos positivos. Para evitar esto, 100 µl de suero fueron preincubados, en una dilución 1:50, con solución de bloqueo, 2 mg/ml de Glutatión-S-transferasa 0,5% polivinil alcohol, 0,8% polivinilpirrolidona, y 2,5% CBS-K (Super ChemiBlock, Chemicon).

3. Transcurrido este tiempo, se eliminó la solución de las placas mediante el empleo de la bomba de vacío, y las placas se lavaron de nuevo 3 veces con 100 µl/pocillo de solución de bloqueo. Para el completo secado de las placas se usó de nuevo el martillo, para que, con suaves golpes, eliminar toda la solución. Después, se añadieron 100 µl/pocillo del anticuerpo secundario (biotina de cabra anti-IgA, IgM, IgG humana o biotina de cabra anti-IgG de ratón en una dilución 1:1000 en solución de bloqueo) y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad a 200 rpm y en continua agitación.
4. Finalmente, se añadió Estreptavidina R-ficoeritrina (Strep-PE) en una dilución 1:750 en la solución de bloqueo y se incubaron las placas en un agitador durante 30 minutos a temperatura ambiente. La Strep-PE es una proteína fluorescente más estable que los fluoróforos convencionales. Se utiliza típicamente para la citometría de flujo, microarrays, ELISA, y otras aplicaciones que requieren alta sensibilidad. Una vez más, se realizaron los 3 lavados de las placas, para finalmente añadir 100 µl de solución de almacenamiento/pocillo y mantener las placas a 4°C hasta el día siguiente, listas para ser leídas por el sistema Luminex 100 Total. Este sistema comprende: el analizador Luminex 100, bandeja manual Luminex XYP por donde se introducen las placas, sistema de inyección Luminex SD, un ordenador Pentium 4 personal con Windows 2000 (Microsoft Corp.), y el software Luminex IS 2.2 SP1 [Luminex Corp. (Austin, TX, USA)].

#### 1.2.5.- Análisis de los datos

Para cada grupo de microesferas la unión de los anticuerpos viene dada por la intensidad media de la fluorescencia obtenida. En cada una de estas determinaciones se obtienen 100 parámetros simultáneamente de un mismo suero con el analizador Luminex 100 Total.

A los valores netos obtenidos se les restó los valores debidos a la autofluorescencia de las propias microesferas y de las uniones inespecíficas al antígeno por parte de un segundo anticuerpo, para cada una de las microesferas. De igual forma, se restaron también los valores de las uniones inespecíficas de los anticuerpos directamente a las microesferas adecuadamente preparadas para el estudio con Glutación-S-transferasa (GST-background). Los valores netos menores a 1 fueron asignados como 1. Los sueros que presentaron un ruido de fondo mayor a 150 de la intensidad media de la fluorescencia debido a las uniones inespecíficas de los anticuerpos directamente a las microesferas preparadas con Glutación-S-transferasa (GST-background) fueron excluidos del análisis. El nivel de corte o “cut-off” para cada uno de los antígenos usados se determinó tras analizar los valores obtenidos. El cálculo del “odds ratio” (OR) y del intervalo de confianza del 95% (IC 95%) para el modelo de regresión logística se realizó usando SAS9.3 [SAS Institute Inc. (Cary, NY, USA)]. Finalmente, con el software GraphPad Prism 6 [GraphPad software (La Jolla, USA)], se obtuvieron los valores kappa ([www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1.cfm](http://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1.cfm)).

## 2.-Reclasificación taxonómica y análisis genético de los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.

### 2.1.- Cepas bacterianas

Utilizando los archivos del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal se recogieron retrospectivamente 52 aislados procedentes de 51 pacientes diagnosticados de bacteriemia causada por *S. bovis* en el periodo de Enero del 2003 hasta Enero del 2010. Estos aislados habían sido identificados previamente mediante la galería comercial API 20 Strep (bioMérieux, Francia) y el sistema semiautomático Wider (Fco. Soria Melguizo, Madrid, España). A todos los pacientes de este estudio se les había realizado una colonoscopia tras el diagnóstico de la bacteriemia. Para conocer las características demográficas y clínicas de todos los pacientes se revisaron las historias clínicas, contándose para ello con el consentimiento del Comité Ético del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Una vez renombrados todos los aislados de *S. bovis*, seguimos trabajando únicamente con los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (14 hemocultivos en total) e incluimos a su vez, varios aislados más como consecuencia de la colaboración con el grupo del Dr. Dennis Hinse (HDZ NRW, Bad Oeynhausen, Alemania). En la tabla 4 se recogen todos los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* incluidos en el estudio.

**Tabla 4.-** Aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* para el estudio de la diversidad genética y sensibilidad antimicrobiana.

Aislados	Fuente	Procedencia
14	Hemocultivos	HRyC, Madrid
9	Origen humano	HDZ, Alemania
18	Animales*	Bélgica y Australia
4	Cepas ATCC	

\*Origen animal: Koala, animales salvajes, paloma, vaca, caballo, cerdo, gato, ternero y perro.

Todos los aislados se conservaron a -80°C en leche semidesnatada esterilizada. El medio de cultivo utilizado para el crecimiento y posterior re-identificación de los aislados fue agar sangre (Biomérieux, Francia). Las condiciones de incubación fueron 35-37°C durante 18-24 h y 10% de CO<sub>2</sub>. Como prueba complementaria para la correcta identificación se realizó la aglutinación correspondiente al antígeno D de Lancefield, con el kit Slidex Strepto Plus (Biomérieux, France).

### 2.2.- Sensibilidad antibiótica

Se determinó la sensibilidad antibiótica de todos los aislados mediante el sistema de microdilución del sistema semi-automatizado WIDER (Fco. Soria Melguizo, Madrid). Este sistema utiliza paneles con sustratos liofilizados para la identificación bioquímica de los

microorganismos y con concentraciones de antimicrobianos en base 2 para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). El inóculo utilizado ( $5 \times 10^4$  UFC/ml) es el recomendado por el CLSI, realizándose la lectura de los paneles a las 18 h tras incubación a 35°C. La confirmación de los patrones de sensibilidad se llevó a cabo de acuerdo al método de microdilución en caldo siguiendo las directrices del CLSI (CLSI, 2010).

### 2.3.-Técnicas moleculares

El análisis y caracterización molecular de todos los aislados, así como el estudio de la diversidad genética de los mismos y localización del elemento genético implicado en el perfil de resistencia antibiótica, se llevaron a cabo con las técnicas moleculares descritas a continuación.

#### 2.3.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico total se utilizó el método comercial Dneasy Blood and Tissue kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando columnas de sílice. El ADN se eluyó con agua estéril. En ocasiones también se utilizaron métodos más rápidos como la inoculación de una colonia directamente en el tubo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o el sobrenadante de una suspensión de cultivo tras hervir 5 minutos y centrifugarlo a 14.000 rpm durante otros 5 minutos.

#### 2.3.2.- Amplificación de ADN

##### 2.3.2.1.- PCR convencional

Las amplificaciones del ADN se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, EEUU). El volumen final de todas las reacciones fue de 15 µl y la mezcla se componía de dos cebadores (5 pmoles del cebador F (Forward) y 5 pmoles del cebador R (Reverse)), 2,4 µl de dNTP (10 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 µl de 10x buffer 10x, 0,2 µl de la enzima *Taq* polimerasa (Roche, Suiza), 1 µl de ADN y agua mili-Q estéril hasta completar el volumen final de 15 µl (tabla 5).

**Tabla 5.-**Cebadores específicos y condiciones de PCR usados para la reclasificación taxonómica de aislados de *S. bovis* y resistencia antibiótica de *S. galloyticus* subsp. *galloyticus*.

Gen	Secuencia (5'-3')	PCR	Ciclos	Tamaño
16S ARNr	16-F: AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA	94°C 30s	30	500 pb
	16-R: AGGCCCGGAACGTATTTCAC	52°C 30s		
		72°C 45s		
<i>Soda</i>	d1: CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC	94°C 30s	30	500 pb
	d2: ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC	37°C 60s		
		72°C 60s		
<i>vanA</i>	5'- ATGGCAAGTCAGGTGAAGATGG	94°C 30s	30	500 pb
	5'- TCCACCTCGCCAACAACCTAACG	52°C 30s		
		72°C 60s		



### 2.3.2.2.- Caracterización del Tn1546 mediante PCR solapante

La PCR solapante u “overlapping” se utiliza para la comparación de patrones de amplificación de secuencias parciales de los elementos genéticos de transferencia horizontal, que cubren toda la estructura del elemento. Los amplicones deben compartir secuencias terminales para poder determinarse su pertenencia al mismo elemento. La secuenciación de fragmentos específicos resulta necesaria tanto para confirmar la asociación de un gen de resistencia al elemento de transferencia, como para identificar alteraciones en regiones específicas (mutaciones, inserciones o deleciones).

Esta técnica se utilizó en un aislado obtenido de las heces de un ternero de origen alemán que presentó resistencia a la vancomicina, utilizando inicialmente los cebadores previamente descritos por el grupo de Woodford (tabla 6).

Las amplificaciones del ADN se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, EEUU). El volumen final de todas las reacciones fue de 50 µl y la mezcla se componía de dos cebadores (5 pmoles del cebador F (Forward) y 5 pmoles del cebador R (Reverse)), 8 µl de dNTP (10mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 µl de buffer 10x, 0,2 µl de la enzima polimerasa *Taq* (Roche, Suiza), 5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de ADN y agua mili-Q estéril hasta completar el volumen final de 50 µl. Las condiciones de la PCR fueron: 10 min a 95°C (1 ciclo de amplificación); 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 45°C, 5 minutos a 72°C (30 ciclos de amplificación); y 10 minutos a 72°C (1 ciclo de amplificación).

**Tabla 6.-**Cebadores específicos y condiciones utilizadas en las PCRs solapantes para la caracterización molecular de Tn1546 (Woodford y cols., 1998).

PCR	Nombre cebadores	Secuencia cebadores (5'-3')	Tamaño fragment
1	P1	GGA TTT ACA ACG CTA AG	1308 pb
	P2	GGC TTT ATC AGA TGC TA	
2	P3	GGT TTT CGA TTA TTG GA	1131 pb
	P4	AAA TAA TAG AAC GAC TC	
3	P5	CGG AAT GCA TAC GGC TC	1298 bp
	P6	AGC CAT ACA GTA ATT A	
4	P7	GGA TGG ACT AAC ACC AA	1273 bp
	P8	TTA AGT ATA ATT CAA CC	
5	P9	GTG AAG GGA TTG AAT TG	1224 bp
	P10	TCC AAT CCC CAA GTT TC	
6	P11	AAA CGA CTA TTC CAA AC	1678 bp
	P12	CAT AGT ATA ATC GGC AA	
7	P13	GTG TGA AAT ATA TTT CT	1792bp
	P14	TTC CAT GCT TAT CAC CC	
8	P15	ATG AAT AGA ATA AAA GT	1941 bp
	P16	GGA TTT ACT ATT ATC AC	
9	P17	AAT TCA TCT ACA TTG GT	1594 bp
	P18	TCA GTC CAA GAA AGC CT	
10	P19	TAT CTT CGC TAT TGG AG	427 bp
	P1	GGA TTT ACA ACG CTA AG	

### 2.3.3.- Separación de ADN

#### 2.3.3.1.- Electroforesis en corriente continua

En esta electroforesis se aplica un campo eléctrico de corriente continua que permite separar fragmentos de ADN comprendidos entre 10 pb y 50 Kb. La resolución de esta técnica para fragmentos mayores de 20 Kb es baja. Esta técnica se ha utilizado para la separación de fragmentos y determinación del tamaño de los productos de PCR amplificados. Los pasos a seguir para realizar la técnica son:

**a) Preparación de geles de agarosa.** La agarosa utilizada fue D-1 Low EEO (Pronadisa) que por su baja electroendósmosis (0,05-0,13%) permite una gran movilidad. Los geles se prepararon en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5x a una concentración del 0,8%, adecuada para la separación de los fragmentos de tamaños comprendidos entre 1 Kb y 10 Kb.

**b) Electroforesis.** Los pocillos de los geles se cargaron con volúmenes variables de ADN (2-4 µl en el caso de productos de PCR) mezclado con un volumen de tampón de carga de 2 a 5 µl. El tampón de carga utilizado fue 6x Loading Buffer (Takara). La separación de los distintos fragmentos se realizó en una cubeta horizontal Wide-Mini Sub Cell Gt (BioRad, EEUU) y con una fuente de corriente Power Pac 300 (BioRad). El tampón usado fue TBE 0,5x a 100 V durante un tiempo variable de 30 minutos para los productos de PCR. El marcador de peso molecular utilizado fue 100 bp DNA ladder (100-1500 pb) (TaKaRa Bio Inc.).

#### 2.3.3.2.- Electroforesis en corriente alterna o electroforesis de campo pulsado (PFGE)

Esta electroforesis utiliza un gradiente de corriente alterna que permite la resolución de moléculas de alto peso molecular (desde 20 Kb a 10 Mb). Los distintos pulsos eléctricos que se producen permiten la reorientación y migración de los fragmentos según su peso molecular. Esta técnica se utilizó primero para el estudio de la diversidad genética de los aislados de *S. bovis* obtenidos de las bacteriemias, y posteriormente para el estudio de la diversidad genética de todos los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* tanto de procedencia humana como animal.

Los pasos previos a la separación son: la extracción de DNA *in situ* en bloques de agarosa, la digestión con distintas enzimas de restricción, y la preparación del gel.

A continuación se detalla todo el proceso realizado:

**a) Extracción de ADN *in situ*:** se partió de un cultivo puro de cada uno de los aislados, inoculándose 2-3 colonias en 100 µl de TE 0,5x (Tris-HCl 10mM pH 7, EDTA 1mM pH 8). Después se adicionaron 10 µl de lisozima (10 mg/ml) y se incubaron durante 10 minutos a 37°C.

Transcurrido este tiempo, se añadieron 3,3 µl de proteinasa K (10 mg/ml). Para la realización de los tacos se mezcló con la solución anterior la misma cantidad de agarosa al 1,2%. Una vez solidificados, los tacos se sumergieron en 1 ml de solución de lisis ES (EDTA 0,5M pH8, sarcosil (lauril sarcosina sódica) 1% y proteinasa K (0,5 mg/ml) y se incubó en

un orbital Innova 4300 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Co., Inc, EEUU) durante 1 hora a 55°C en agitación continua.

Finalmente, se eliminó la solución TE y se lavaron los tacos con agua estéril ultra-pura durante 10 minutos 2 veces a 50°C y 4 veces más con TE, a la misma temperatura y durante el mismo tiempo. Después del último lavado se añadió nuevo TE para su almacenamiento a 4°C hasta su utilización.

**b) Digestión de ADN:** se utilizó un tercio de los tacos de agarosa. Estos fragmentos se depositaron en un tubo eppendorf con 100 µl de solución tampón (Buffer 10x y BSA 0,1%) y *Sma*I (40 U/µl), enzima de restricción procedente de *Serratia marcescens* (New England BioLabs, Inc, Reino Unido). La digestión tuvo lugar a 37°C durante al menos 4 horas.

**c) Preparación de geles de agarosa:** para la separación de los fragmentos de ADN, se cargaron los moldes de agarosa, previamente digeridos, en un gel de agarosa D5 (Pronadisa) al 1% en TBE 0,5x. Las características de la agarosa utilizada permiten una separación óptima de fragmentos de ADN por PFGE, puesto que su bajo valor de electroendósmosis (<0,120) permite una mayor movilidad electroforética.

**d) Electroforesis de campo pulsado (PFGE):** la separación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo en el sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, La Jolla, CA., EEUU), aplicando las siguientes condiciones: 6 v/cm<sup>2</sup> con rampas de 2-5 segundos durante 6,5 horas y de 20-40 segundos durante 13,5 horas. En cada gel se incluyeron dos carriles con marcadores de peso molecular que incluyeron 50 líneas diferentes en un rango desde 48,5 hasta 1.018,5 Kb (Lambda Ladder PFGE Marker, New England).

#### 2.3.3.3.- Tinción y visualización

La visualización de los fragmentos separados por electroforesis se realizó por tinción de los geles con bromuro de etidio a una concentración final de 0,2 µg/ml. El bromuro de etidio es un agente que se intercala en el ADN y que permite visualizar las moléculas de ácido nucleico mediante luz ultravioleta. Todos los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con el equipo Gel Logic 100 Imaging System (Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EEUU).

#### 2.3.3.4.- Purificación y secuenciación de ADN

La secuenciación del ADN comenzó en 1.977, cuando Frederick Sanger desarrollo el método dideoxi y Maxam y Gilbert desarrollaron el método químico (Maxam y Gilbert, 1977; Sanger y cols., 1977). Fue realizada utilizando el kit “ABI Prism BigDye TerminatorCycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems, EEUU) en el secuenciador automático (ABIPRISM 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems, EEUU).

El secuenciador automático ABI Prism 377 es un sistema de electroforesis y detección de fluorescencia controlada por un microprocesador que se utiliza para la secuenciación automática o análisis de fragmentos empleando el método de secuenciación automática en geles desnaturalizantes.

Los productos de PCR obtenidos se purificaron con ExoSAP-IT® purification kit (USB Corp., Cleveland, OH, EEUU). Para ello, se añadieron 0,2 µl de ExoSAP-IT® (Fosfatasa alcalina y Exonucleasa) y 1,8 µl de agua mili-Q previamente mezclados, a 5 µl del producto de PCR. Esta mezcla fue introducida en el termociclador (37°C 15 minutos, 80°C 15 minutos). Tras esto, se mezcló de nuevo 3 µl del producto purificado con un 1 µl del cebador 16S-Forward 0,25 µM, 2 µl de BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-100 y 4 µl del tampón y agua mili-Q c.s.p. 20 ciclos). A continuación se realizó la precipitación del producto con 3 µl de acetato sódico 3 M pH 4,6; 62,5 µl de etanol al 95% y 14,5 µl de agua mili-Q. Después de agitarlo convenientemente se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Después se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 250 µl de etanol al 70%. Posteriormente se volvió a centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos y se volvió a eliminar el sobrenadante. Finalmente, se secó en el sistema SAVANT Speed Vac Concentrator (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

Los productos obtenidos fueron secuenciados con el secuenciador automático ABI Prism 377 (PE, Norwalk, CONN, EEUU).

#### 2.3.3.5.- Análisis bioinformático

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó mediante el programa Chromas (versión 2.32, Technelysium Pty. Ltd, Tewantin, Australia) y la comparación entre las distintas secuencias se realizó con las previamente descritas y publicadas en el GenBank Database del NCBI mediante la utilización del programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>, National Center for Biotechnology Information).

Para la construcción del dendrograma e interpretación de los diferentes perfiles electroforéticos correspondientes a cada aislado se utilizó el software Phoretix 5.0, basado en el coeficiente de Dice (Nonlinear Dynamics Ltd., Reino Unido).

#### 2.4.-Identificación bacteriana mediante MALDI-TOF MS

Se utilizó el sistema MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, EEUU) como técnica complementaria para la identificación de las subespecies bacterianas pertenecientes al grupo *S. bovis*. Las colonias crecidas, no más de 24 horas, se depositaron sobre la tarjeta metálica y se extendieron adecuadamente. Posteriormente, se añadió 0,7 µl de matriz y se dejó secar al aire. Finalmente se introdujo la placa en el sistema y mediante la comparación de los espectros de masas generados con los de la librería se obtuvo su identificación.

#### 2.5.- Hibridación

La identificación de genes o secuencias en genomas o plásmidos se realizó por hibridación del ADN con sondas específicas obtenidas por PCR. Este proceso se realiza en los siguientes pasos: extracción, separación, transferencia y fijación del ADN a una membrana, marcaje de las sondas, la hibridación del ADN y el revelado.

### 2.5.1.- Extracción de ADN

Para la realización de esta técnica se ensayaron dos métodos diferentes de extracción de ADN:

**a)** Extracción de ADN *in situ* en la que el ADN se embebe en agarosa. Se realizó mediante el protocolo detallado en el apartado 3.3.2.- a).

**b)** En el otro método empleado para la extracción de ADN, se partió de un cultivo puro en placa y se inoculó una colonia aislada en 5 ml de BHI. Tras 18-24 horas de incubación a 37°C, se recogió 1 ml del cultivo en un eppendorf estéril, se centrifugó 5 minutos para recoger las células, eliminando el sobrenadante y se procedió al lavado de las células de nuevo con 1 ml de agua estéril. Se añadieron 200 µl de solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10mM, Tris/ClH pH 8,25 mM, lisozima 5 mg/ml) y se resuspendió nuevamente utilizando el vortex. Se incubó durante al menos 1 hora a 37°C, añadiéndose después 40 µl de ClNa 5 M para posteriormente dejarlo 5 minutos a temperatura ambiente y provocar la lisis de los esferoplastos. Para eliminar las proteínas se adicionaron 400 µl de fenol/ cloroformo/ ácido isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente hasta mezclar las dos fases, las cuales se separaron de nuevo centrifugando 5 minutos a 13.000 rpm. La fase acuosa se pasó a un tubo limpio y se repitió el paso anterior hasta que no apareció interfase de proteínas.

Tras recoger la fase acuosa, se añadieron 560 µl de isopropanol y se mezcló invirtiendo varias veces el eppendorf para precipitar el ADN. Se puede favorecer la precipitación dejando la mezcla a -20°C durante 30 minutos. Después de centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al 70% para eliminar las sales. Se dejó 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó de nuevo a 13.000 rpm durante 5 minutos. El precipitado se dejó secar y se resuspendió en 40 µl de agua destilada con 1 µl de ARNasa 20 µg/ml. El ADN se conservó a -20°C hasta su utilización.

### 2.5.2.- Separación de los fragmentos de ADN

Según el método de extracción usado, la separación de los fragmentos de ADN fue distinta. A continuación se especifica en cada apartado lo que se hizo según el método de extracción usado:

**a)** La separación de los fragmentos de ADN obtenidos por la extracción de ADN *in situ* se realizó por electroforesis en corriente alterna o PFGE. La digestión con *CeuI*, enzima de restricción procedente de *Chlamydomonas eugametos*, (New England Biolabs, Inc, Ipswich, MA, EEUU), tuvo lugar a 37°C durante al menos 4 horas. Se cargaron los moldes de agarosa, previamente digeridos, en un gel de agarosa D5 (Pronadisa) al 1% en TBE 0,5x. La separación de los fragmentos se llevó a cabo en el sistema CHEF-DRIII (BioRad, La Jolla, EEUU) con las siguientes condiciones: 6v/cm<sup>2</sup> con rampas de 1-20 segundos durante 22 horas. En cada gel se incluyeron dos carriles con marcadores de peso molecular que incluyeron 50 líneas diferentes en un rango desde 48,5 hasta 1018,5 Kb (Lambda Ladder PFGE Marker, New England).

**b)** Para la separación de los fragmentos de ADN, obtenido por el segundo método de extracción de ADN, se empleó electroforesis continua. La separación de los distintos

fragmentos se realizó en una cubeta horizontal, con tampón TBE 0,5x a 25v durante un total de 18 horas.

Después de la tinción y visualización del gel en el transiluminador, se expuso 2 minutos a la luz ultravioleta y se desnaturalizó durante 90 minutos en una solución de NaOH 0,4 N.

### 2.5.3.- Transferencia y fijación del ADN a una membrana

La transferencia a una membrana de nylon (Hybond N+, GE Healthcare Bio- Sciences AB, Uppsala, Suecia) se realizó mediante el método Southern Blot (Sambrook y cols., 1989), durante 48 horas, utilizando NaOH 0,4 N como tampón de transferencia. Después se lavó durante 5 minutos con una solución de SSC 2x (Citrato sódico 30 mM, NaCl 0,3 M) y un lavado final de 2 minutos con TrisHCl 0,5 M, pH=7,0. El ADN se fijó por exposición a la luz ultravioleta durante 3 minutos.

### 2.5.4.- Obtención y marcaje de la sonda

El método de obtención para cada una de las sondas empleadas en el estudio se detalla a continuación:

- *vanA*: 9,38 µl de un producto de amplificación de PCR de la cepa de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* en estudio.
- 16S ARNr: 9,38 µl de un producto de amplificado de PCR de la cepa de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* en estudio.

Se utilizó el kit de Amersham Megaprime ADN labelling RPN 1006, que contiene multiprimer buffer, BSA y fragmento Klenow. La sonda se marcó siguiendo las recomendaciones del fabricante: se mezcló en un eppendorf 30,5 µl de agua miliQ, 5 µl de oligonucleótidos y 2 µl de cada una de las sondas y se llevó todo ello a ebullición durante 5 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 10 µl de tampón, 1,5 µl de Klenow y 1 µl de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP (10mCi/ml), se mezcló e incubó 20 minutos a 37°C. La sonda se desnaturalizó durante 5 minutos a 95°C, se pasó a hielo y se añadió al cilindro de hibridación.

### 2.5.5. Hibridación radioactiva

En primer lugar, se calentó el horno de hibridación (Hybridiser HB-1D, Techne) a 60°C y se prehibridó el filtro con los 10 ml del tampón de hibridación (suministrado por el kit Amersham) dentro de un cilindro durante 15 min. Tras la prehibridación se añadió la sonda desnaturalizada y se dejó hibridando 18-24 horas a la temperatura programada. Pasado este tiempo se eliminó el tampón radioactivo y se lavaron los filtros con:

- 2x SSC-0,1% SDS 20 minutos a temperatura ambiente (2 veces)
- 1x SSC-0,1% SDS 20 minutos a 60°C y agitación (1 vez)
- 0,7x SSC-0,1% SDS 20 minutos a 60°C (este lavado se repitió hasta que se consiguió una señal de aproximadamente 2-5 µCi en el filtro).



### 2.5.6.- Revelado

La señal se detectó por exposición en placas de autoradiografía Hyperfilm-ECL (GE Healthcare Bio-Sciences AB), dejándolo a -70°C. El tiempo de exposición depende de la señal radioactiva de la membrana. El revelado de las placas se realizó de manera automatizada utilizándose productos de la casa Kodak.

### 2.6.- Transferencia del elemento genético Tn1546 mediante conjugación

El método utilizado para la transferencia del elemento genético Tn1546 fue la conjugación en medio sólido. Las dos cepas receptoras usadas para dicho experimento fueron:

- *Enterococcus faecium* OG-1RF, cepa receptora de referencia para estudios de conjugación. No posee ningún plásmido y es resistente a rifampicina y ácido fusídico por mutación cromosómica.
- *Enterococcus faecalis* JH2-2, cepa receptora para estudios de conjugación. No posee ningún plásmido y es resistente a rifampicina y ácido fusídico por mutación cromosómica.

La cepa donadora (*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*) y la receptora se cultivaron a partir de una colonia aislada en 5 ml de BHI a 37°C durante 18-24 horas. Sobre un filtro estéril Millipore (0,22 µm) colocado sobre las placas de BHI agar, se añadieron 200 µl de la mezcla previamente hecha en un eppendorf (500 µl del cultivo de la placa receptora y 500 µl del cultivo de la cepa donadora, relación 1:1), incubándose a 37°C durante 24 horas.

Con la ayuda del vortex, se resuspendió el crecimiento sobre el filtro en 1ml de suero salino. Tras centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos, el pellet se sembró en las placas de BHI agar con 25 µl/ml de ácido fusídico, 30 µl/ml de rifampicina y 6 µl/ml de vancomicina y se incubó a 37°C durante 24 horas.

Para calcular la frecuencia de conjugación, se dividió el número de transconjugantes por ml por el número de células donadoras por ml.

### 3.- Secuenciación y análisis bioinformático del genoma de la cepa número 78 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* resistente a glucopéptidos

Con el fin de obtener una mayor información y de elucidar cómo y dónde se insertó el elemento genético Tn1546, que le confiere resistencia a los glucopéptidos a la cepa número 78 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, se procedió a la secuenciación del genoma de esta cepa utilizando la plataforma de secuenciación Ion Torrent por parte de la Unidad de Genómica del Hospital Universitario Ramón y Cajal (UCA GT).

El tamaño del genoma de esta cepa es de aproximadamente 2,4 Mb, y para su secuenciación se utilizó la plataforma de ultrasecuenciación Personal Genome Machine (PGM) de Ion Torrent siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Generación de la librería de ADN:
  - a. digestión enzimática del ADN bacteriano de nuestra bacteria;
  - b. ligación de los adaptadores;

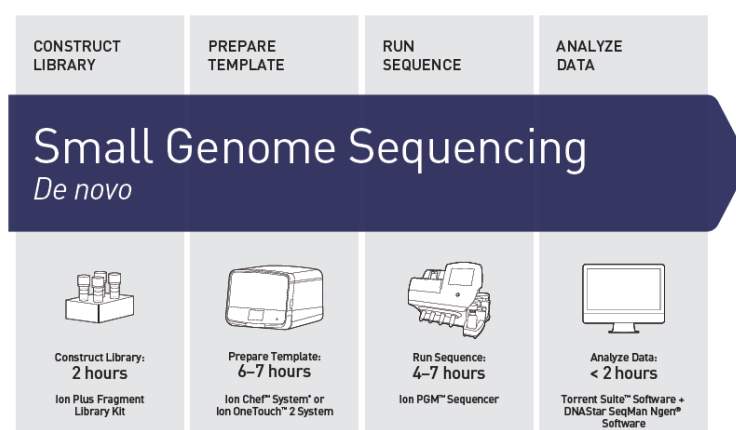
- c. selección por tamaño en gel;
- d. amplificación de la librería.

Trás cada paso, se procedió a la purificación del producto obtenido. Para la realización de la librería se partió de un input de 100 ng de ADN bacteriano y se utilizó el kit Xpress Plus Fragment Library (Life Technologies). Una vez se obtuvo la librería, se valoró el tamaño y la concentración de la muestra mediante electroforesis capilar, en el bioanalizador Tape Station 2200 (Agilent Technologies), con el kit High Sensitivity DNA.

2. Secuenciación propiamente dicha, en dos pasos:

- a. Generación del template con el kit Ion One Touch 200 Template v2D, partiéndose de 20 µl de la librería previamente hecha. En esta fase se realizó una PCR en emulsión en el sistema Ion One Touch y posteriormente el enriquecimiento de la muestra. Una vez generado el template, se realizó un control de calidad de la muestra utilizando el kit Ion Sphere Quality Control en un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen).
- b. Secuenciación con el chip. Se utilizó el kit Ion PGM Sequencing 200, y se obtuvieron fragmentos de 200 pb de tamaño medio. El chip utilizado fue Ion 316 Chip v2. Los datos brutos obtenidos fueron dados en formato FASTQ.

El análisis de los datos se realizó utilizando el software MIRA del Servicio Ion Torrent, donde se procedió al ensamblaje de las secuencias obtenidas. El resultado de este ensamblaje dio lugar a aproximadamente 200 “contigs”.



**Figura 19.-** Resumen esquemático del proceso completo del sistema de secuenciación Ion Torrent (<http://ioncommunity.lifetechnologies.com//>).

El análisis bioinformático de los datos obtenidos corrió a cargo de la empresa Era7 ([www.era7.com](http://www.era7.com)).





---

# Resultados

---

“Da siempre lo mejor de  
ti, y lo mejor vendrá...”

---

Madre Teresa de Calcuta

---



## IV. RESULTADOS

### 1.- Resultados del estudio serológico

Inicialmente, se estudió la respuesta inmunitaria frente a 4 de las proteínas del pili de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, a la proteína FliC de *S. Typhimurium* y a 15 proteínas específicas de *H. pylori* en 1.512 sueros de casos de CCR y controles sanos pareados en edad y sexo. Todos los experimentos se realizaron con códigos encriptados, sin conocer la filiación de los sueros. Se excluyeron 344 sueros por corresponder a población control no pareada o por motivos experimentales (sueros no pipeteados, número de conteo de las microesferas no adecuado...) y otros cuatro sueros más tras comprobar que se trataban de casos de cáncer gástrico.

Finalmente, los análisis se realizaron en un total de 582 casos de CCR (291 hombres y 291 mujeres; edad media 62,2 años, rango 31-85) con sus 582 controles pareados en edad y sexo (291 hombres y 291 mujeres; edad media 62,4 años, rango 34-84).

Para su validación se contó con sueros de referencia, previamente definidos como *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-positivo y *S. Typhimurium*-positivo, así como también con sueros de referencia de *H. pylori* seleccionados en el Laboratorio del Dr. Pawlita y controles negativos para todos ellos.

Éste es el primer estudio serológico de estas características, por lo que se realizaron diferentes análisis variando el punto de corte para así poder considerar a un suero como positivo. A su vez, se calculó el “odds-ratio” (OR) y el intervalo de confianza 95% (IC 95%) para cada uno de los antígenos por separado.

#### 1.1.- Respuesta inmunitaria a *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y *S. Typhimurium* y cáncer colorrectal

Inicialmente se diseñaron dos estrategias empleando diferentes sustratos:

1. Microesferas de poliestireno acopladas directamente al extracto de proteínas obtenidas del cultivo de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. pasteurianus* y *S. lutetiensis*.
2. Proteínas purificadas procedentes de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (pili Gallo1569, Gallo2039, Gallo2178 y Gallo2179) y de la proteína FliC de *S. Typhimurium*, unidas directamente a las microesferas de poliestireno.

Se rechazó el primer esquema de trabajo por carecer de utilidad para la monitorización de la respuesta inmunológica en humanos, debido principalmente a su baja sensibilidad y a una posible reacción cruzada con proteínas presentes en otros *Streptococcus* spp. Finalmente se decidió trabajar exclusivamente con las proteínas específicas purificadas.

### 1.1.1.- Respuesta inmunitaria a las proteínas específicas Gallo1569, Gallo2039, Gallo2178 y Gallo2179 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y cáncer colorrectal

Se realizaron varias aproximaciones para evaluar la respuesta inmunitaria frente a estas proteínas. En primer lugar se estudió la respuesta de manera individual a cada una de las proteínas y se realizaron todos los análisis estadísticos pertinentes para la elección del punto de corte más adecuado (valor de Intensidad Media de la Fluorescencia por encima del cual se considera la respuesta al antígeno ensayado como positiva). Como se puede apreciar en la figura 7, la respuesta inmunitaria frente a las proteínas de los pili de forma individual fue: para Gallo2039 se observó el mayor valor de la Intensidad Media de la Fluorescencia, siendo éste de 1.938 (OR: 1,50; IC 95%: 1,05-2,15); seguida de Gallo2179 con 504 (OR: 1,50; IC 95%: 1,05-2,15); mientras que Gallo2178 y Gallo1569 presentaron los valores más bajos, con 22 (OR: 1,46; IC 95%: 1,02-2,09) y con 139 (OR: 0,91; IC 95%: 0,61-1,34, dato no significativo), respectivamente.

**Tabla 7.-** Asociación CCR con la respuesta inmunitaria a las proteínas de los pili de forma individual usando como punto de corte el 10% de los controles sero-positivos.

Proteína	Punto de corte (IMF)	Ac	Controles	Casos	OR (95% CI)
Gallo1569	139 (10% controles positivos)	-	503	508	1,0
		+	87	82	0,91 (0,61-01,34)
Gallo2039	1938 (10% controles positivos)	-	58	83	1,0
		+	562	557	1,50 (1,05-2,15)
Gallo2178	22 (10% controles positivos)	-	532	509	1,0
		+	58	81	1,46 (1,02-2,09)
Gallo2179	504 (10% controles positivos)	-	532	507	1,0
		+	58	83	1,50 (1,05-2,15)
FliC	2962 (5% controles positivos)	-	562	542	1,0
		+	28	48	1,78 (1,10-2,88)

IMF: Intensidad Media de la Fluorescencia

Ac: Respuesta inmunitaria

En una segunda aproximación, se estudió conjuntamente la respuesta inmunitaria frente a las proteínas de los pili Gallo2178, Gallo2179, Gallo1569 y Gallo2039, la asociación con el CCR fue mayor, presentando un OR de 1,82 y un IC 95%: 1,15-2,87. La exclusión de Gallo2039 en el análisis hizo que esta asociación fuese incluso mayor (OR: 2; IC 95%: 1,10-3,63). Finalmente, la combinación de las proteínas Gallo2178 y Gallo2179 fue la que mostró la mayor asociación con el CCR (OR: 3,38; IC 95%: 1,44-7,94) (tabla 8).

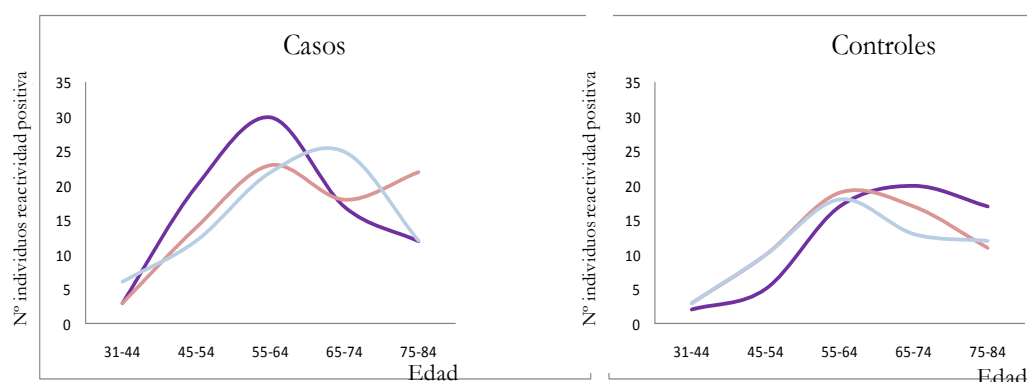
**Tabla 8.-** Asociación del CCR con la respuesta inmunitaria al conjunto de proteínas de los pili.

Proteína	Punto de corte(IMF)	Ac	Controles	Casos	OR (95% CI)
Gallo2178,2179,1569,2039	10% controles positivos	-	394	359	1,0
		Cualquier pili	196	231	1,29 (1,02-1,64)
Gallo2178,2179,1569,2039	10% controles positivos	< 2 pili	559	536	1,0
		≥ 2 pili	31	54	1,82 (1,15-2,87)
Gallo2178,2179,1569	10% controles positivos	< 2 pili	573	557	1,0
		≥ 2 pili	17	33	2,00 (1,10-3,63)
Gallo2178,2179	10% controles positivos	< 2 pili	583	567	1,0
		≥ 2 pili	7	22	3,38 (1,44-7,94)

IMF: Intensidad Media de la Fluorescencia

Ac: Respuesta inmunitaria

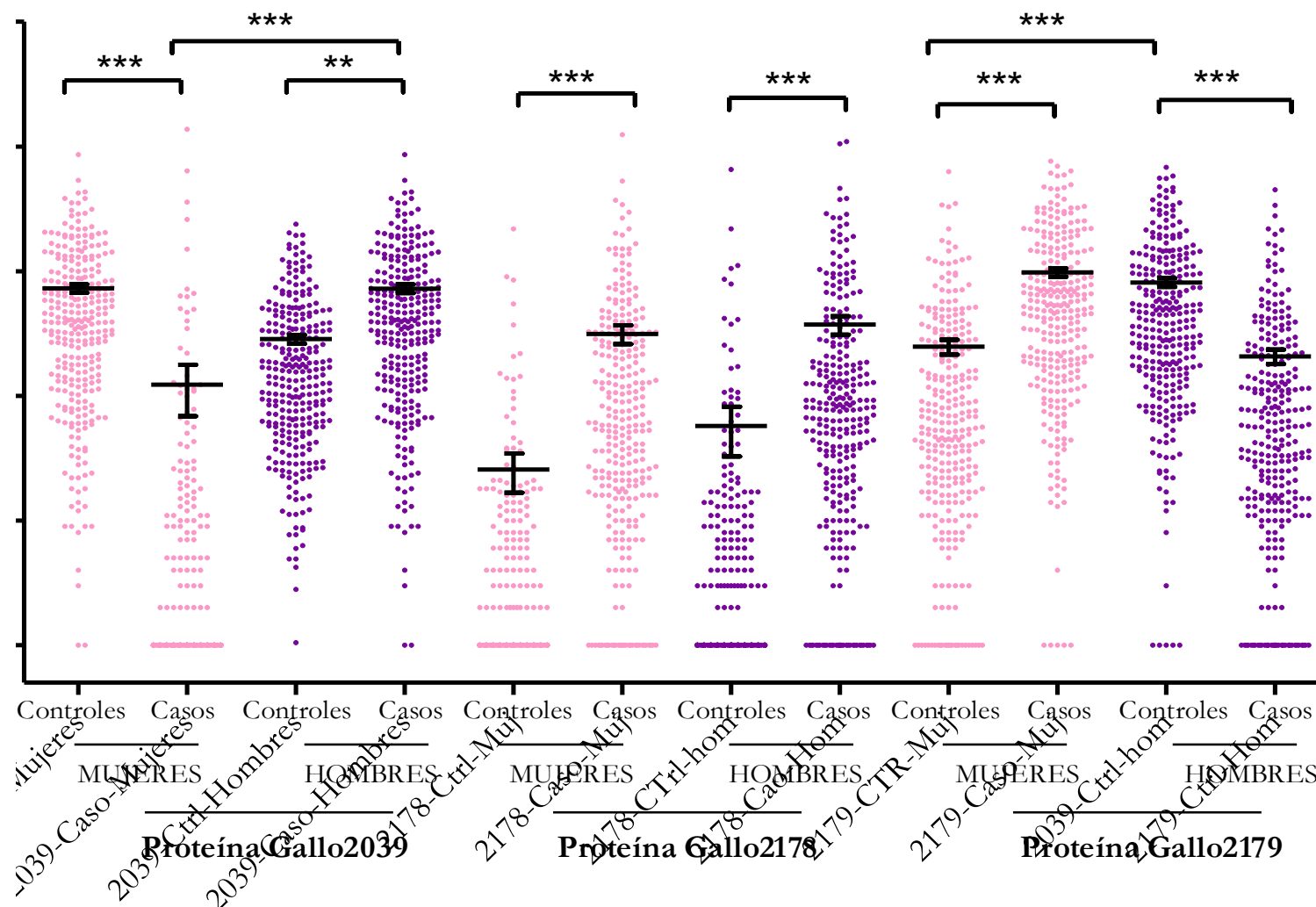
Se realizó un análisis estratificando por edad y se relacionó con la Intensidad Media de la Fluorescencia para cada uno de los antígenos, tanto de forma individual como conjunta, para una mejor evaluación de la respuesta. En el grupo control no se detectó ninguna asociación significativa con las proteínas Gallo1569, Gallo2039 y Gallo2178. Únicamente para la proteína Gallo2179 se observaron valores de la Intensidad Media de la Fluorescencia mayores de 500 con más frecuencia en las personas de mayor edad, pero sin llegar a ser significativo estadísticamente. Curiosamente, en el grupo de casos sólo se detectó asociación significativa con la proteína Gallo2179 de manera individual, en las personas de menor edad (OR: 2,54; IC 95%: 1,51-4,28). También se observó una mayor asociación al estudiarse de manera conjunta Gallo2179 y Gallo2178 (OR: 7,86; IC 95%: 1,78-34,70) (figura 20).

**Figura 20.-** Distribución de la reactividad a las proteínas Gallo2039, Gallo2178 y Gallo2179 de forma individual según la edad.

Posteriormente se realizó un análisis estratificando según sexo. En la figura 21 se puede ver representada la distribución de la población por sexo para cada una de las proteínas de forma individual. Al observar esta gráfica, se aprecia que para la proteína Gallo2039 los valores de la

Intensidad Media de la Fluorescencia son mayores en los casos que en el grupo control. Con respecto a Gallo2178, tanto para los hombres como para las mujeres la respuesta fue más elevada en los casos de CCR que en los respectivos controles. Para la proteína Gallo2179, se observó que en el grupo de las mujeres los valores fueron mayores para los caso que para el grupo control.

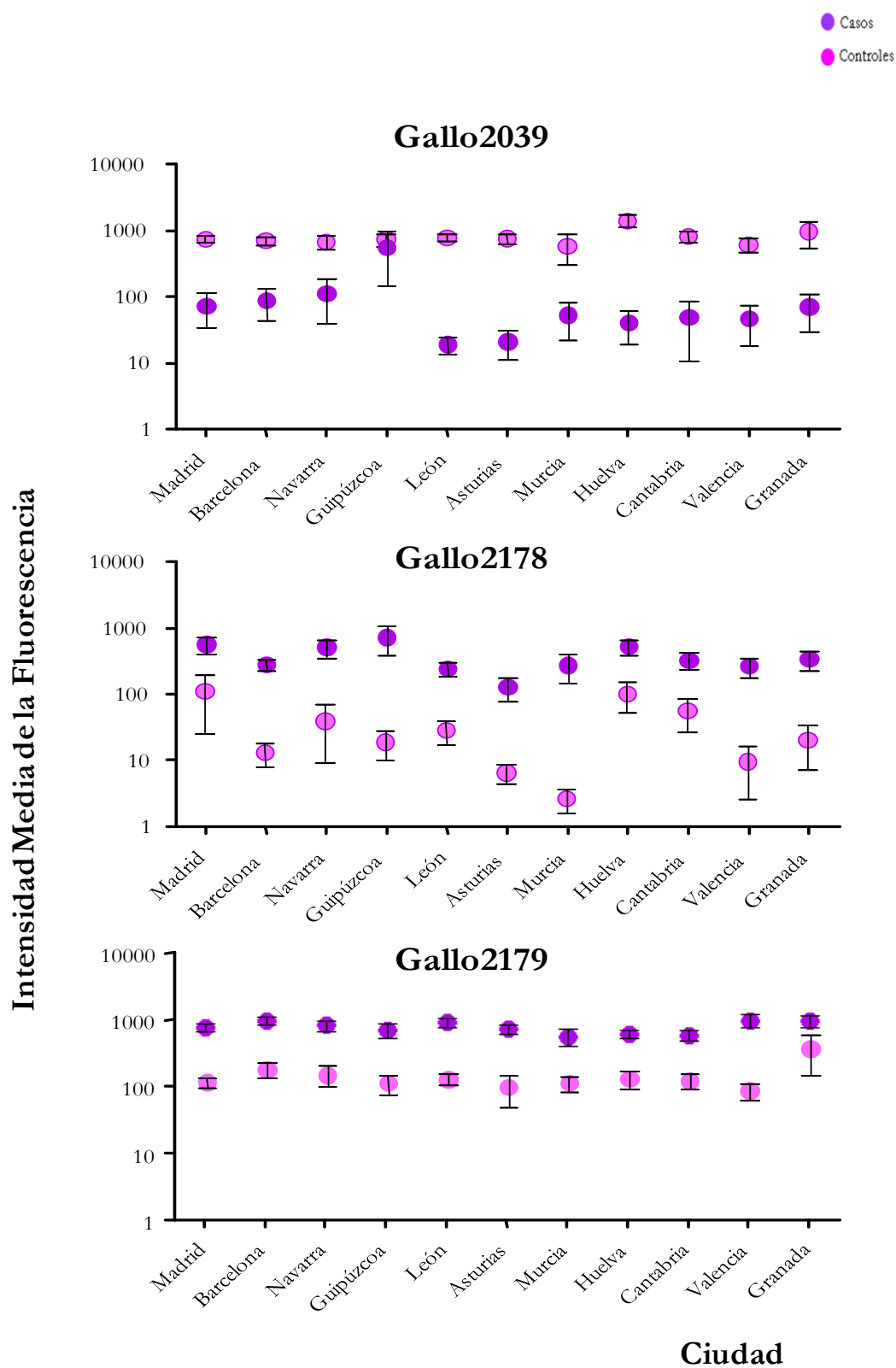
Para el grupo de los hombres la asociación de CCR y la respuesta frente a Gallo2039 (OR: 1,89; IC 95%: 1,13-3,19), Gallo2178 (OR: 1,98; IC 95%: 1,17-3,35) y al conjunto Gallo2178, Gallo2179 y Gallo2039 (OR: 2,46; IC 95%: 1,25-4,81) fue significativa. La asociación observada con las proteínas Gallo2178, Gallo2179 y Gallo2039, estaría estrechamente relacionada y es dependiente de la presencia o no de la proteína Gallo2039; es decir, la exclusión de esta proteína del análisis hace que la asociación desaparezca. En las mujeres existió asociación significativa frente a Gallo2179 (OR: 1,79; IC 95%: 1,08-3) y frente al conjunto de las proteínas Gallo2178 y Gallo2179 (OR: 4,49; IC 95%: 1,27-15,91).



**Figura 21.-** Distribución de la población según el sexo para cada una de las proteínas específicas Gallo2039, Gallo2178 y Gallo2179 de forma individual.



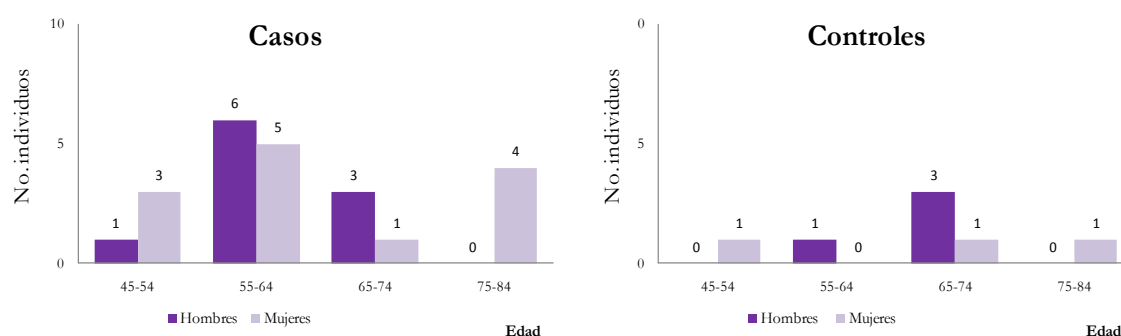
Otra de las aproximaciones que se realizó fue el estudio la reactividad a estas proteínas en función del área geográfica (figura 22).



**Figura 22.-** Distribución geográfica de la población de casos y controles en función de la ciudad de recogida de las muestras y su relación con las proteínas Gallo2039, Gallo2178 y Gallo2179 de forma individual.

Como se puede apreciar en la figura anterior, existen diferencias significativas según la ciudad de recogida de las muestras y las proteínas de los pili de *S. gallohyticus* subsp. *gallohyticus*. Para la proteína Gallo 2039, las ciudades de León, Asturias, Huelva y Cantabria presentaron una mayor diferencia respecto a la reactividad entre casos y controles. De igual forma sucedió con la proteína Gallo 2178 donde la mayor diferencia se observó en Barcelona, Guipúzcoa, Asturias, Murcia y Valencia; mientras que para Gallo 2179 apenas se observaron diferencias.

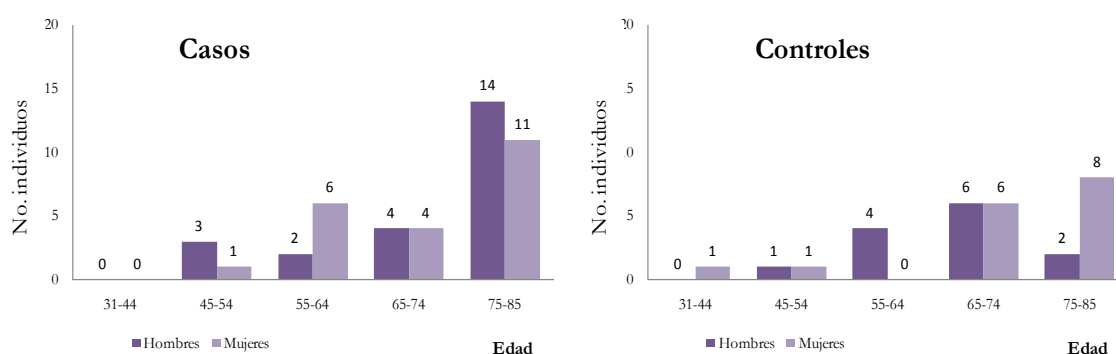
Finalmente, al analizar de manera conjunta los datos resultantes de las dos proteínas Gallo2179 y Gallo2178, que como vimos antes mostraron una mayor asociación con el CCR, sólo se contó con 29 del total de los 1.164 sueros pareados. De estos, 7 pertenecían al grupo control, mientras que los 22 restantes pertenecieron al grupo de casos; la edad promedio fue de 63, 6 años de edad, siendo 15 hombres y 14 mujeres (figura 23). Como resultado a destacar, estos 29 sueros presentaron los valores más elevados de la Intensidad Media de la Fluorescencia de todos los sueros estudiados.



**Figura 23.-** Distribución por edad de los casos y controles pareados cuando se analizaron conjuntamente las proteínas Gallo2178 y Gallo2179.

### 1.1.2.- Respuesta inmunitaria a *S. Typhimurium* y cáncer colorrectal

Para la evaluación de la respuesta inmunitaria frente a la proteína FliC de *S. Typhimurium*, se fijó como punto de corte aquel que clasifica al 5% de los controles como sero-positivos. Se pudo apreciar que la respuesta inmunitaria frente a esta proteína fue ligeramente superior en el grupo de los casos, aunque con una significación muy débil (OR 1,78, IC 95%: 1,10-2,88). Como dato adicional, podemos decir que esta asociación se observó exclusivamente en los casos con una edad superior a 65 años; no existiendo diferencias entre hombres y mujeres como se muestra en la figura 24.



**Figura 24.-** Distribución por edad de la población de casos y controles al estudiar la reactividad a la proteína FliC.

## 1.2.- Respuesta inmunológica a *H. pylori* y cáncer colorrectal

### 1.2.1.- Estudio de la sero-prevalencia de *H. pylori* mediante ELISA

La determinación de anticuerpos específicos de tipo IgG frente a *H. pylori* se realizó en todos los sueros de todas las personas incluidas en el estudio (n=1.164).

Siguiendo las recomendaciones del fabricante para el inmunoensayo comercial (ELISA) se estableció el punto de corte en 12 U/ml. Un total de 874 sueros (75%) presentaron títulos de anticuerpos de tipo IgG anti-*H. pylori*  $\geq 12$  U/ml (seropositivos) y 290 (25%)  $< 8$  U/ml (seronegativos). Los sueros se consideraron como dudosos cuando presentaron valores entre 8-12 U/ml, sin embargo, para el análisis de los datos éstos fueron tratados de igual manera que los resultados negativos.

**Tabla 9.-** Distribución de los resultados serológicos de *H. pylori* según el sexo.

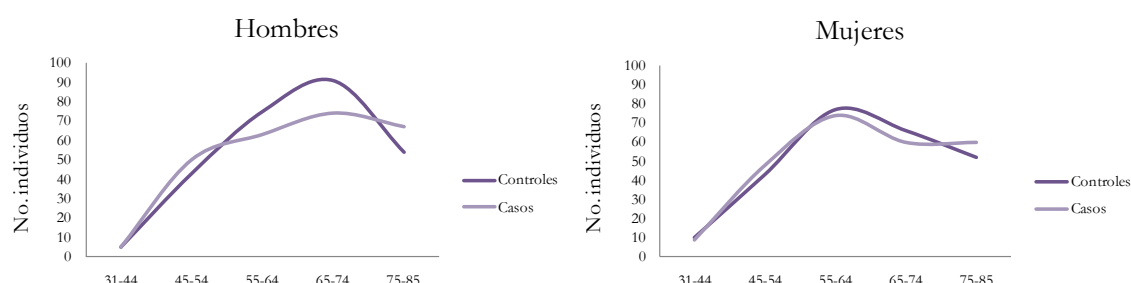
	Hombres				Mujeres		
	<i>H. pylori</i> -	<i>H. pylori</i> +	Total		<i>H. pylori</i> -	<i>H. pylori</i> +	Total
<b>Casos</b>	65	226	291	<b>Casos</b>	66	225	291
<b>Controles</b>	75	216	291	<b>Controles</b>	84	207	291
<b>Total</b>	140	442	582	<b>Total</b>	150	432	582

En los hombres la seroprevalencia observada en el grupo de los casos fue del 77,6%, mientras que en el grupo control fue del 74,2%. En las mujeres la seroprevalencia fue del 77,3% para los casos y del 74,2% para el grupo control. Como se puede apreciar, los datos son muy similares en ambos grupos (tabla 9).

### 1.2.2.- Estudio de la sero-prevalencia de *H. pylori* mediante Serología Múltiple

La Serología Múltiple para *H. pylori* se basa en la combinación del ensayo de inmunoabsorción marcada con Glutación S-transferasa (GST) con la tecnología xMAP de Luminex para describir la respuesta inmunológica a 15 proteínas específicas de *H. pylori* (Michael y cols., 2009; Waterboer y cols., 2005).

El criterio empleado para definir un suero como sero-positivo frente a *H. pylori* había sido previamente evaluado en el grupo del Dr. Pawlita y se definió como una respuesta positiva al menos frente 4 de las 15 proteínas estudiadas en el ensayo (Michael y cols., 2009). En la figura 25 se puede ver representada la distribución observada tanto para hombres como para mujeres según grupo de edad.



**Figura 25.-** Distribución de los casos y de los controles considerados sero-positivos frente a *H. pylori* según la edad.

Estos datos señalan que existe una mayor seroprevalencia en los hombres mayores de 65 años, mientras que en la población femenina no se aprecia ninguna diferencia.

### 1.2.3.- Comparación ELISA vs Serología Múltiple

En este apartado se comparó los dos métodos utilizados en el análisis de la respuesta inmunitaria frente a *H. pylori* en la población de estudio. Como se aprecia en las tablas 10 y 11, con el método convencional ELISA existen un mayor número de resultados negativos, tanto para los casos como para los controles

**Tabla 10.-** Comparación de los resultados obtenidos mediante el método ELISA *vs* Serología Múltiple en los casos para hombres y mujeres según la edad.**Hombres**

	Casos				
	ELISA IgG		Serología múltiple		Total
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
35-44	6	3	5	4	9
45-54	42	17	50	9	59
55-64	55	22	63	14	77
65-74	66	12	74	4	78
75-85	57	11	67	1	68

**Mujeres**

	Casos				
	ELISA IgG		Serología múltiple		Total
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
35-44	9	2	9	2	11
45-54	45	14	48	11	59
55-64	69	18	74	13	87
65-74	49	19	60	8	68
75-85	53	13	60	6	66

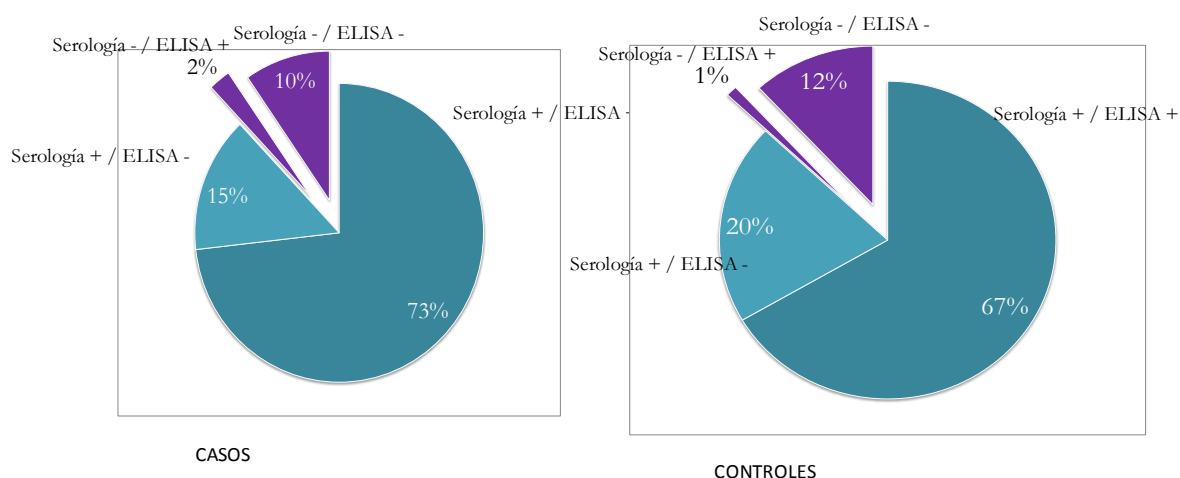
**Tabla 11.-** Comparación de los resultados obtenidos mediante el método ELISA *vs* Serología Múltiple el grupo control para hombres y mujeres según la edad.**Hombres**

	Controles				
	ELISA IgG		Serología múltiple		Total
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
35-44	2	6	5	3	8
45-54	34	12	43	3	46
55-64	58	19	75	2	77
65-74	78	23	91	10	101
75-85	44	15	54	5	59

**Mujeres**

	Controles				
	ELISA IgG		Serología múltiple		Total
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
35-44	9	1	10	0	10
45-54	36	16	43	9	52
55-64	67	20	77	10	87
65-74	55	28	66	17	83
75-85	40	19	52	7	59

Por último, en la figura 26, se representan las diferencias entre los datos obtenidos con los distintos métodos utilizados en nuestro estudio.



**Figura 26.-** Representación esquemática de la concordancia y discrepancia entre las dos técnicas ensayadas (ELISA *vs* Serología múltiple) para la evaluación de la respuesta serológica frente a *H. pylori*.

### 1.3.- Relación de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. Typhimurium* y *H. pylori* y cáncer colorrectal

Con el fin de valorar si existe una asociación de estos tres microorganismos con el desarrollo del CCR, se comparó de forma conjunta la respuesta inmunitaria frente a *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* en relación a otros patógenos como *H. pylori* y *S. Typhimurium*. Para ello se analizaron únicamente los 29 sueros con reactividad a las dos proteínas Gallo2178 y Gallo2179 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. De estos 29 sueros, 21 fueron también positivos para *H. pylori*, mientras que únicamente 4 fueron positivos para *S. Typhimurium*.

Por otro lado, cuando se consideraron los resultados positivos de *S. Typhimurium* y *H. pylori*, en conjunto, se apreció que 69 de los sueros presentaron reactividad para ambos microorganismos a la vez.

Aunque el número de resultados considerados como sero-positivos es muy bajo (si tenemos en cuenta sólo aquellos que presentaron una reactividad positiva al conjunto de todas las proteínas) y limita la extrapolación de los resultados a la población, podemos concluir que aparentemente no existe ninguna asociación específica entre *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. Typhimurium* y *H. pylori* y el CCR, si son considerados conjuntamente.

## 2.- Reclasificación taxonómica

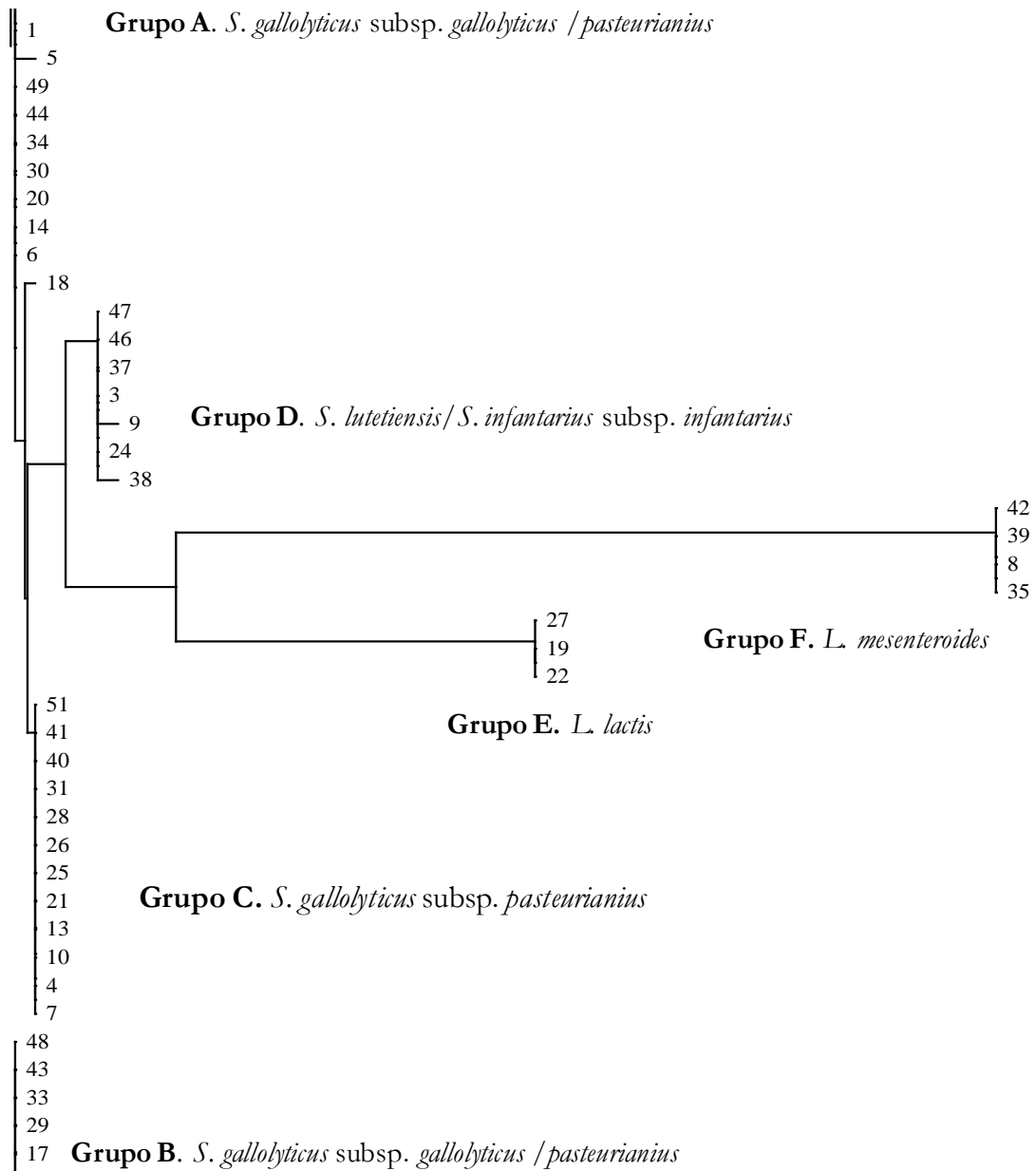
Para la identificación de la colección de *S. bovis* obtenida de los archivos del servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal se emplearon tres aproximaciones diferentes: sistema API 20 Strep (bioMérieux, Francia), secuenciación del gen 16S ARNr y del gen *sodA*.

Los aislados de la colección (n=52 aislados) obtenida retrospectivamente de los archivos del Servicio de Microbiología, fueron clasificados como: *S. bovis* II/2 (n=29), *S. bovis* I (n=14), *S. bovis* II/4 (n=2), *Lactococcus lactis* (n=3), y *Leuconostoc* spp. (n=4). Curiosamente, todos los aislados, incluidos aquellos que finalmente no pertenecieron al grupo *S. bovis*, dieron positiva la reacción de aglutinación para el grupo D de *Streptococcus*. En la identificación mediante la secuenciación del gen 16S ARNr se obtuvieron: 14 *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, 24 *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, 7 *Streptococcus* spp., 3 *Lactococcus lactis*, y 4 *Leuconostoc mesenteroides* (figura 27).

Cuando estos mismos aislados fueron identificados basándonos en la secuencia interna del gen *sodA* el resultado obtenido fue: 14 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, 24 *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, 2 *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, 5 *Streptococcus lutetiensis*, y 3 *L. lactis*.

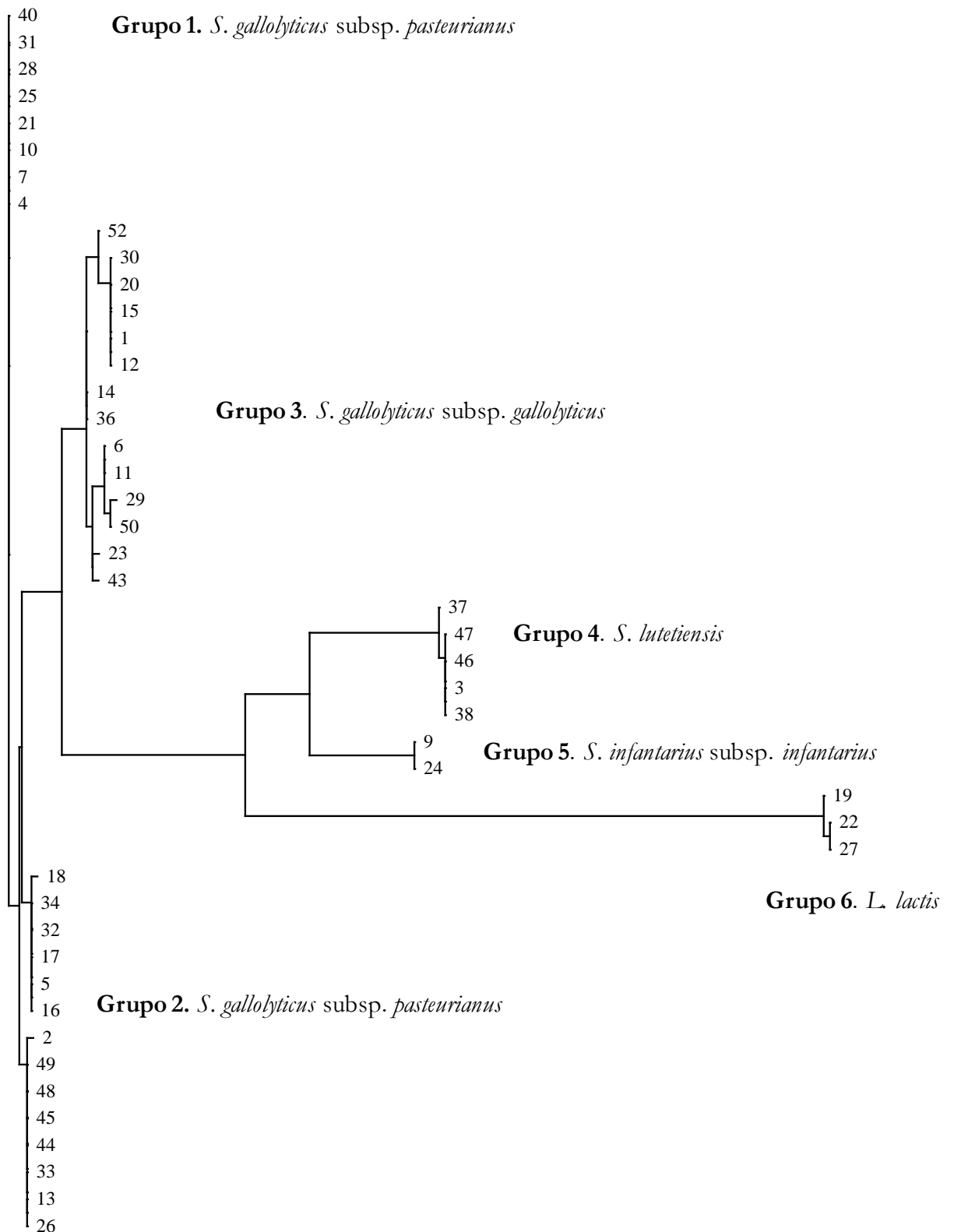
En 7 de los aislados la identificación basada en la secuenciación y amplificación del gen 16S ARNr no fue satisfactoria, y sólo fue posible a nivel de especie. Por el contrario, cuando se utilizó el análisis y posterior secuenciación del gen *sodA*, 3 de los aislados se resolvieron como *S. infantarius* subsp. *infantarius* y 4 como *S. lutetiensis*. Así mismo, los 4 aislados previamente identificados como *L. mesenteroides* mediante el gen 16S ARNr no amplificaron con los cebadores del gen *sodA*.

Si analizamos detenidamente todos los resultados, mediante las secuencias obtenidas con el uso del gen *sodA* el poder discriminatorio fue mayor y los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* quedaron separados filogenéticamente en dos grupos, como podemos observar en la figura 28. En esta representación han sido excluidas las secuencias nucleotídicas clasificadas como *L. mesenteroides*.



**Figura 27.-**Representación gráfica de las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante la secuenciación del gen 16S ARNr.





**Figura 28.-**Representación gráfica de las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante la secuenciación del gen *sodA* (n=48).

[illegible]

**Figura 29.-** Comparación secuencias aminoacídicas de las proteínas SodA en los diferentes alelos detectados.

Por último, se quiso valorar la utilidad del sistema de identificación MALDI-TOF MS, en la identificación de las especies y subespecies del grupo *S. bovis*. Mediante este sistema, las cepas bacterianas quedaron identificadas como: *S. galloyticus* (n=27), *L. mesenteroides* (n=4), *L. lactis* (n=3), y *S. lutetiensis* (n=6). Actualmente el análisis a nivel de subespecie no es posible mediante el empleo de esta técnica. Además, en 12 del total de los aislados la identificación no fue fiable.

En la tabla 12, con el objetivo de lograr una visión comparativa de los distintos sistemas de identificación, se esquematizan las identificaciones obtenidas mediante las tres técnicas. En la primera columna se muestra la identificación con el API 20 de Strep, sistema de identificación basado en pruebas bioquímicas, y ampliamente utilizado en todos los laboratorios de microbiología; en la segunda columna, la identificación mediante la secuenciación del gen 16s ARNr y en las siguientes, la identificación obtenida mediante secuenciación del gen *sodA*, método considerado de referencia, y por MALDI-TOF MS, respectivamente.

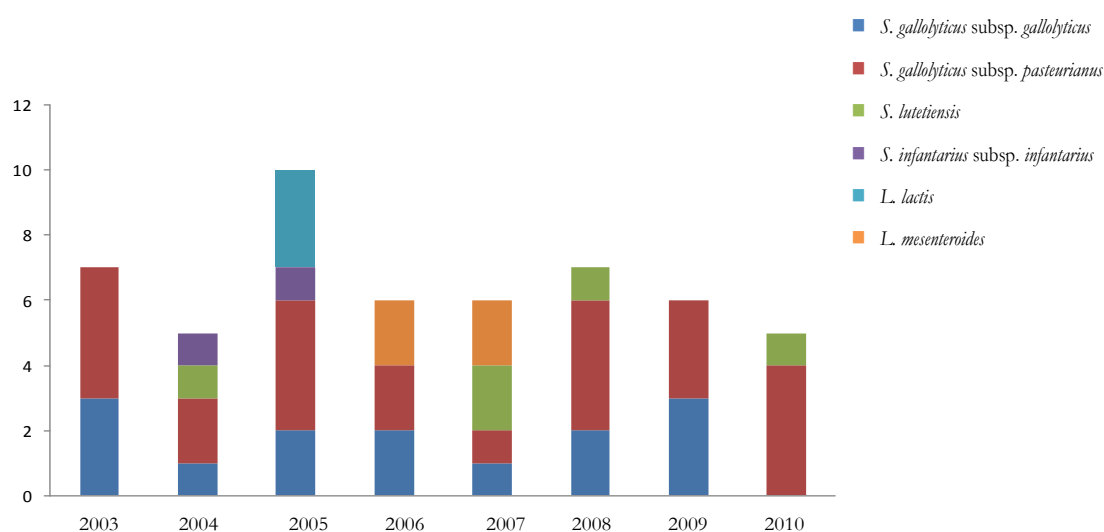
**Tabla 12.-** Identificación los aislados de *S. bovis* según el sistema de identificación utilizado.

[illegible]

## 2.1.- Características clínicas de los pacientes

Se revisaron las historias clínicas de los 51 pacientes con bacteriemia documentada por *S. bovis*. La edad media de los pacientes fue de  $73,5 \pm 15$  años (rango de edad de 27 a 98 años; moda, 82 años), compuestos por 28 hombres (54,9%) y 23 mujeres (45,1%).

La media de episodios descritos fue de 6,5 episodios/año, con un máximo de 10 episodios a lo largo del año 2005. La mayoría de los casos se concentraron entre los meses de Abril y Junio, observándose una incidencia menor entre el periodo comprendido de Octubre a Diciembre del citado año.



**Figura 30.-** Número casos/año de bacteriemias en el hospital Ramón y Cajal identificados como *S. bovis* durante el periodo 2003-2010.

Las peticiones de hemocultivos al Servicio de Microbiología, procedían del Servicio de Urgencias, con una frecuencia del 51%, seguido por el Servicio de Medicina General (16%), Servicio de Cuidados Intensivos (10%), Servicio de Gastroenterología (8%), y otros Servicios (15%).

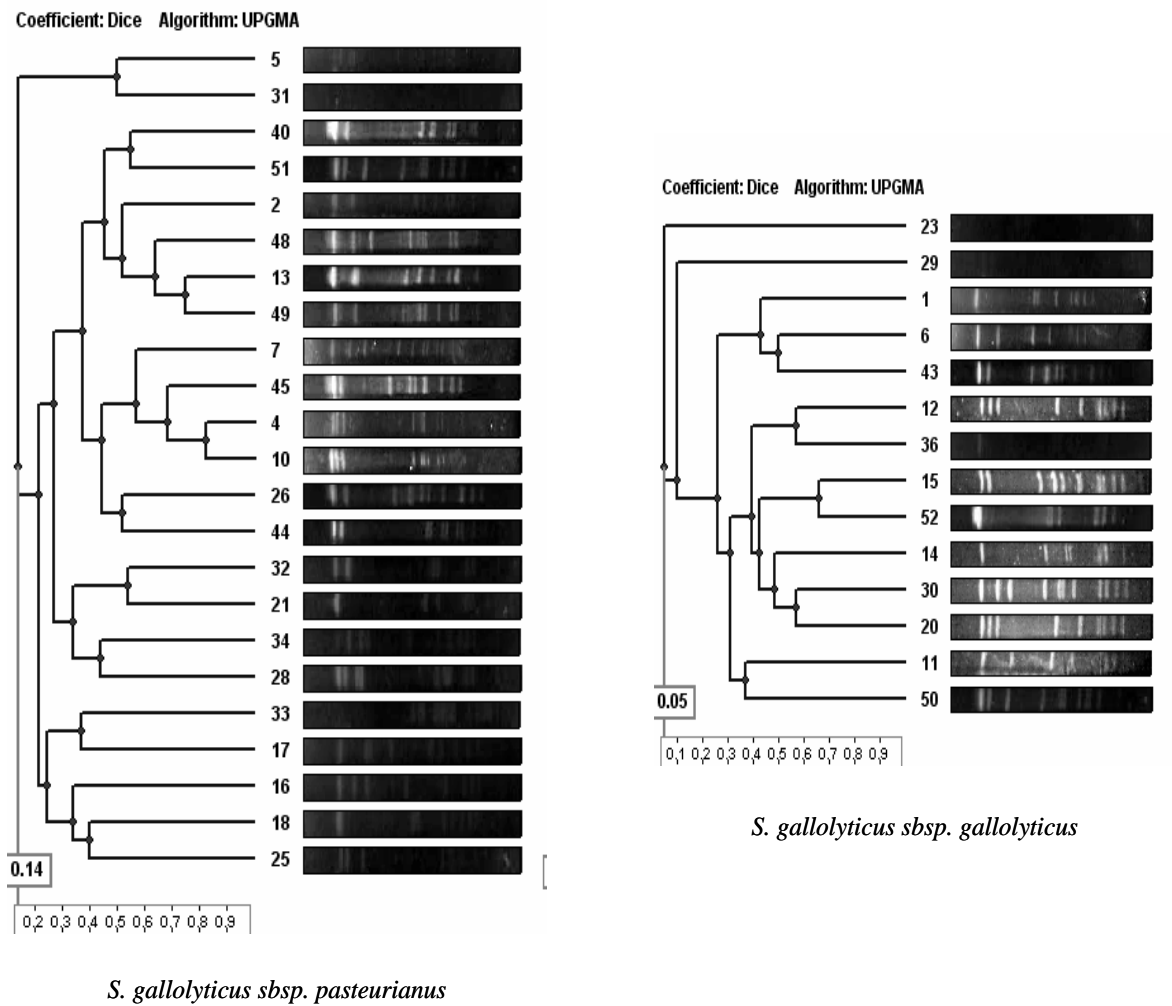
Los síntomas más frecuentes que refirieron los pacientes a su llegada al hospital fueron principalmente, fiebre y dolor abdominal. En la tabla 13 se recogen las principales manifestaciones clínicas de los pacientes. La enfermedad más comúnmente asociada a la bacteriemia por el grupo *S. bovis* fue la relacionada con desórdenes hepatobiliares (53%), seguida de endocarditis (17,6%), enfermedades cardiovasculares (11,7%), diverticulitis y/o pólipos en el colon (11,7%), carcinoma del tracto digestivo (8%), anemia ferropénica (6%), y otras (4%). Durante el periodo de recogida de datos un paciente falleció. Cabe reseñar el desarrollo de bacteriemia por aislados genéticamente diferentes de *S. galloyticus* subsp. *pasteurianus* en una mujer con una diferencia de 3 años entre cada episodio.

**Tabla 13.-** Principales características clínicas de los pacientes con bacteriemia por *S. bovis*.

	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	<i>S. lutetiensis</i>	<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. mesenteroides</i>
Colecistitis / Colangitis	3	5	1			
Cirrosis	2	10	1		1	1
VHC		5	1		1	
Apendicitis		1				
Adenoma colon	1	4				1
Pólipos colon	2	7		1		
Carcinoma rectal	1					
Diabetes		2				
Cardiopatía		3	1	1		1
Endocarditis	1	6				
Estenosis Mitral		1				
Insuficiencia		1				
ITU	1				1	
Cáncer vesícula			1			
Cáncer prostate	1					
Cáncer pulmón			1			
Linfoma tipo	1					
Leucemia	1					

## 2.2.- Estructura poblacional de los aislados de *S. bovis*

El análisis de la estructura poblacional mediante PFGE de los 52 aislados procedentes de 51 pacientes con bacteriemias por *S. bovis* comprendidos entre Enero del 2003 hasta Enero del 2010, mostró 2 patrones claramente diferentes: el primero compuesto por los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, que a su vez se dividieron en 3 grupos visiblemente distintos; y el segundo compuesto por todos los aislados identificados como *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, los cuales presentaron una gran diversidad de patrones entre ellos (figura 31).



**Figura 31.-** Dendrograma realizado con el software Phoretix 5.0 para analizar la relación genética mediante el análisis de los patrones de PFGE.

### 2.3.- Sensibilidad a antibióticos

Los resultados obtenidos muestran patrones de sensibilidad frente a penicilina, ampicilina, amoxicilina-clavulánico, oxacilina, quinupristin/dalfopristina, linezolid, y rifampicina. Como era de esperar, todos los estreptococos ( $n=45$ ) presentaron una resistencia de bajo nivel frente al grupo de los aminoglucósidos. Los aislados de *L. mesenteroides* presentaron resistencia a vancomicina y teicoplanina.

También se observó que, 16 de los aislados presentaron resistencia de alto nivel ( $\text{CMI}_{50} > 1.000 \text{ mg/l}$ ) a estreptomycin, mientras que no se encontró resistencia de alto nivel a gentamicina.

Los distintos porcentajes de resistencias a los diferentes antibióticos de cada subespecie bacteriana se muestran en la tabla 14.

**Tabla 14.-** Resistencia antibiótica de los aislados de *S. bovis*.

	Porcentaje Resistencia Antibióticos (CMI <sub>50</sub> )					
	Str <sup>a</sup>	Lev	Er	Cd	Fos	SxT
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> n=14	42,8 (≤1000)	14,2 (2)	35,7 (≤0,5)	35,7 (≤0,5)	35,7 (≤32)	35,7 (≤1/19)
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i> n=24	20,8 (≤1000)	8,3 (≤1)	37,5 (≤0,5)	25,0 (≤0,5)	29,1 (≤32)	25,0 (≤1/19)
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> n=2	0 (≤1000)	0 (≤1)	0 (≤0,5)	0 (≤0,5)	0 (≤32)	0 (≤1/19)
<i>S. lutetiensis</i> n=5	60,0 (>1000)	40,0 (2)	60,0 (>2)	60,0 (>2)	20,0 (≤32)	20,0 (≤1/19)
<i>L. lactis</i> n=3	66,6 (>1000)	0 (2)	33,3 (≤0,5)	33,3 (≤0,5)	66,6 (>64)	66,6 (>2/38)
<i>L. mesenteroides</i> n=4	0 (≤0,25)	0 (2)	50,0 (≤0,5)	25,0 (≤0,5)	25,0 (≤0,32)	25,0 (≤1/19)

a: Resistencia Alto Nivel (>1000 mg/L). Str: estreptomicina; Lev: levofloxacino; Er: eritromicina; Cd: clindamicina; Fos: fosfomicina; SxT: trimetropim sulfametoxazol.

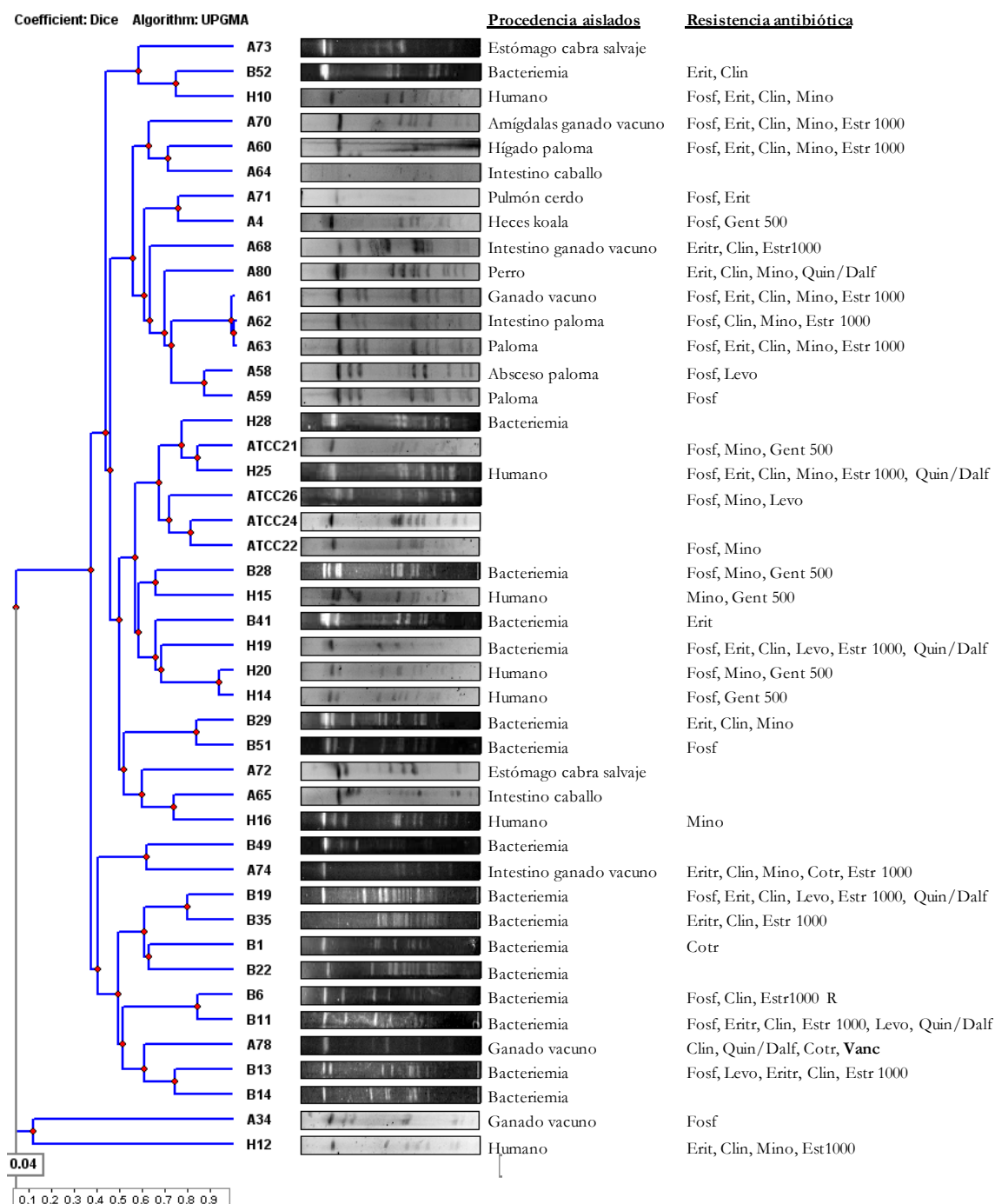
### 3.- Estudio de la diversidad genética y sensibilidad antimicrobiana de los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* de origen humano y animal

Como hemos comentado ya en varias ocasiones, a pesar de que *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* está relacionado con patologías como endocarditis y el CCR, este microorganismo frecuentemente se encuentra formando parte de la microbiota gastrointestinal tanto en humanos como en animales, donde también puede causar enfermedades.

Para determinar y comparar las características de aislados con origen humano y origen animal se incluyeron 14 aislados reclasificados como *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, procedentes de hemocultivos de pacientes del Hospital Universitario Ramón y Cajal, junto a una colección de 31 aislados procedentes de Alemania (previamente detallada en la sección de Material y Métodos).

#### 3.1.- Estructura poblacional de los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

En la figura 32 se puede ver el análisis de los resultados de PFGE, donde además se indica la procedencia de cada uno de los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* incluidos en el análisis, así como la resistencia antibiótica.



**Figura 32.-** Dendrograma patrón de PFGE realizado con el software Phoretix 5.0 para los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.

A pesar de la variabilidad genética que se puede apreciar, se observa claramente que los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* causantes de bacteriemias recogidos en el hospital Ramón y Cajal se agrupan, y que curiosamente uno de los aislados de procedencia animal (A78) se encuentra entre ellos. La cepa 78 resultó ser de un ternero y presentó resistencia a los glucopéptidos, por lo que posteriormente se procedió al estudio y caracterización molecular de esta cepa y del elemento genético que le confería dicha resistencia. Existe a su



vez, cierto agrupamiento entre todos los aislados de origen animal; mientras que el resto de los aislados presentaron una mayor diversidad.

### 3.2.- Sensibilidad a antibióticos

En general podemos afirmar que todos los aislados presentaron una elevada sensibilidad a los antibióticos ensayados (tabla 15). En los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* procedentes de colonización humana, encontramos la tasa de resistencia más altas para fosfomicina, que fue de un 11,1%, y minociclina con un 15,5%. También pudimos observar que el 8,9% de los aislados presentaron resistencia a eritromicina y clindamicina.

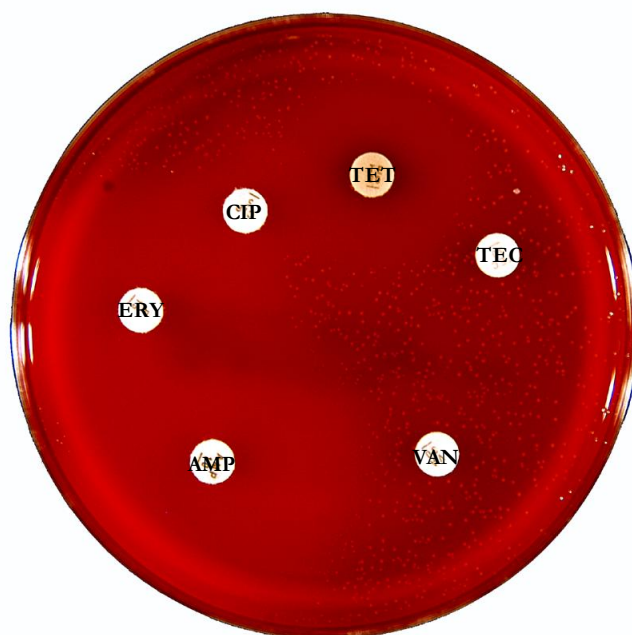
En los aislados procedentes de animales, se detectó un 17,8% de resistencia a eritromicina y un 13,3% a minociclina. Un dato singular fue el hecho de que uno de los aislados obtenido de las heces de un ternero presentó resistencia a vancomicina y teicoplanina (CMI=256 mg/L) (figura 33).

En el caso de las bacteriemias las mayores tasas de resistencia se fueron para eritromicina y clindamicina, detectándose en un 15,5% del total de todos los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.

**Tabla 15.-** Resistencia antibiótica de los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.

Porcentaje Resistencia Antibióticos (%)										
	Gm <sup>a</sup>	Str <sup>b</sup>	Lev	Er	Cd	Fos	SxT	Q/D	Min	Va
<b>Bacteriemias</b>	0	11,1	6,67	15,5	15,5	11,1	2,2	4,4	ND	0
<b>Humanos</b>	8,9	6,7	2,2	8,9	8,9	11,1	0	0	15,5	0
<b>Animales</b>	2,2	13,3	2,2	17,8	15,5	13,3	11,1	2,2	13,3	2,2
<b>Cepas ATCC</b>	0	0	0	2,2	0	6,7	0	0	6,7	0

a: Resistencia Alto nivel (>500 mg/L); b: Resistencia Alto Nivel (>1000 mg/L).  
Gm: gentamicina Str: estreptomicina; Lev: levofloxacino; Er: eritromicina; Cd: clindamicina;  
Fos: fosfomicina; SxT: trimetropim sulfametoxazol; Q/D: Quinupristina/Dalfopristina; Min:  
Minociclina; Va: vancomicina. ND: No determinado.



**Figura 33.-** Antibiograma en placa donde se puede observar la resistencia a los glucopéptidos de la cepa número 78 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.

### 3.3.- Caracterización del elemento genético Tn1546

En primer lugar se optó por la estrategia de PCR solapante y la posterior secuenciación de los amplicones obtenidos. De este modo se identificó la presencia del gen *vanA* dentro de un elemento de 10.850 pb, correspondiente a un transposón de la familia de Tn1546.

Todas las regiones adyacentes al gen *vanA* presentaron una gran homología con el transposón Tn1546 descrito por primera vez en una cepa de *Enterococcus faecium* (Arthur y cols., 1993), a excepción de una delección de aproximadamente 600 pb en la región *vanY-vanZ*. Tras varios intentos, la amplificación de esta región no fue posible, por lo que se optó por la secuenciación del genoma completo de esta cepa, con el fin de obtener una mayor información acerca de la adquisición de la resistencia a vancomicina.

### 3.4.- Transferencia del material genético Tn1546

Se evaluó por conjugación *in vitro* la transferencia del elemento genético Tn1546-like mediante la selección con vancomicina de la célula receptora. No se obtuvieron resultados positivos en varios experimentos independientes, sugiriendo que este aislado no transfiere este mecanismo de resistencia a glucopéptidos por conjugación.

### 3.5. Localización del gen *vanA*

Para la localización del gen *vanA*, se realizó la hibridación de membranas de nylon, donde se había transferido el ADN previamente digerido con *CeuI* y con las sondas específicas de productos de PCR *vanA* y 16S ARNr. Este proceso nos permite comprobar si el gen se localiza en un plásmido o en el cromosoma bacteriano. En la figura 34, se puede observar la imagen del gen con un perfil de restricción de ADN característico para *S. gallolyticus* subsp.

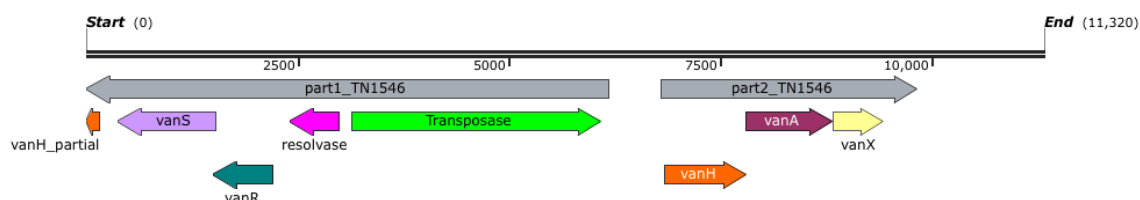
*gallolyticus* obtenido con la enzima *CenI*, se muestran también las imágenes resultado de las hibridaciones con *vanA* y 16S ARNr.

Al superponer las imágenes obtenidas de las membranas de hibridación, se pudo observar que la banda correspondiente al gen *vanA* también mostró hibridación positiva con el gen 16S ARNr, por lo que el elemento de transposición *Tn1546-like* se situó inserto en el cromosoma bacteriano.

#### 4.- Análisis del genoma de la cepa número 78 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* resistente a los glucopéptidos

En la secuenciación masiva se obtuvieron 260 “contigs” que fueron finalmente alineado.. El tamaño del cromosoma se correspondió con 2.698,137 bp que incluían 2.070 genes codificantes de proteínas, 58 ARNt y 4 copias del ARN ribosomal. Cabe destacar la detección de 111 transposasas asociadas a diferentes elementos (*IS1167*, *IS1272*, *IS1548-like*, *IS4-like*, *IS630-SpnII* e *IS66*).

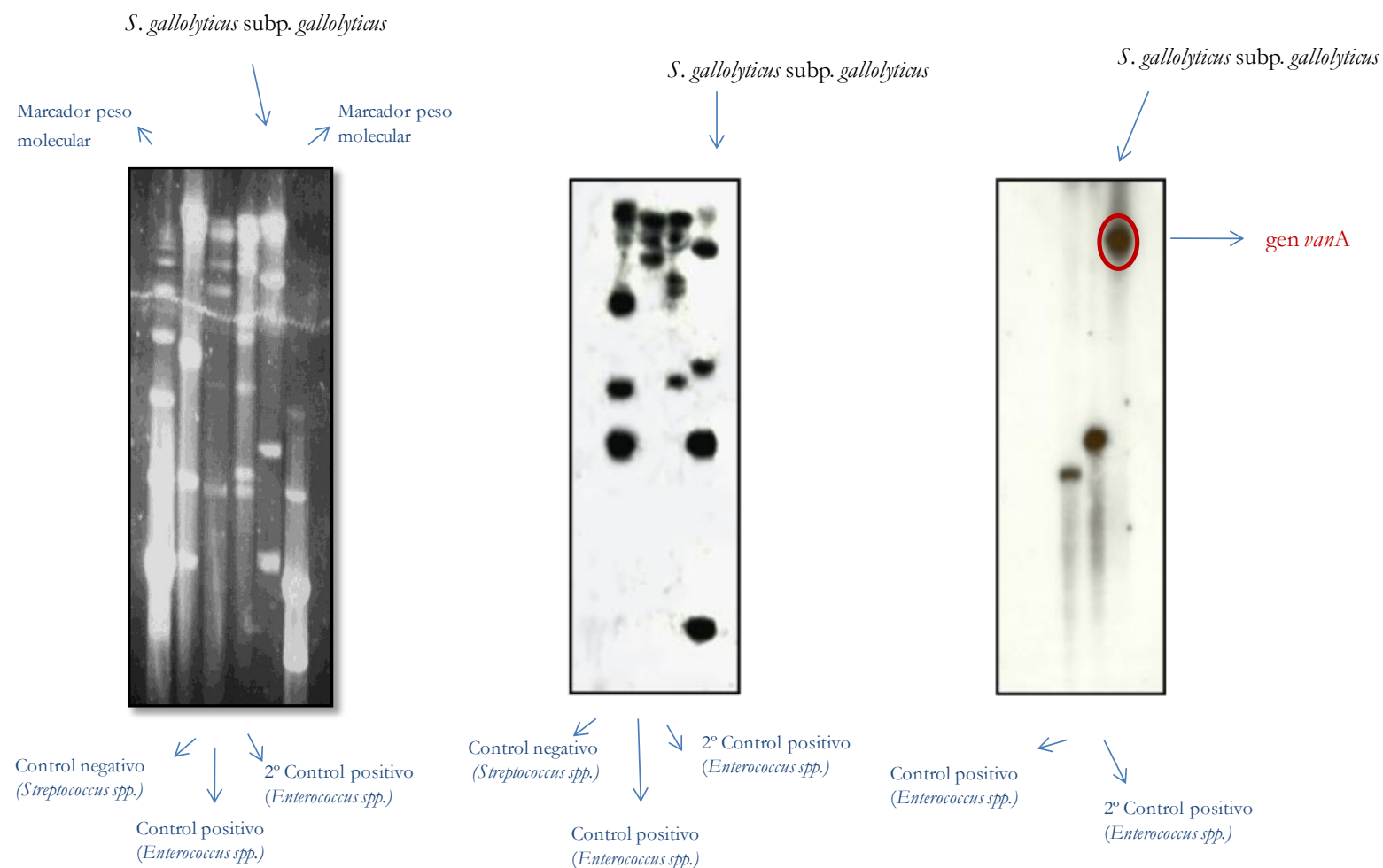
Se encontraron 114 genes homólogos a *Streptococcus pneumoniae*, incluyendo *Tn5251*, y 72 genes inicialmente descritos en *Streptococcus pyogenes*. También se localizó el elemento *Tn1546-like* homólogo al de *E. faecium* y que confería la resistencia a vancomicina. El análisis informático demostró la inversión de la parte proximal con una delección de 1.835 nucleótidos en el extremo final del transposón (9.016 a 10.851 pb) como se aprecia en la figura 35. La delección implica a los genes *vanY* y *vanZ*. Estos hallazgos complementan los resultados obtenidos mediante PCR solapante.



**Figura 35.-** *Tn1546* de la cepa número 78 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* de procedencia animal.

Posteriormente se identificaron varios genes de resistencia a metales pesados, zinc y cadmio, y a antibióticos, estreptogramina A acetiltransferasa, virginamicina liasa y estreptomicina aminoglicósido-6-adeniltransferasa, así como el sistema completo para la producción de una bacteriocina que aún no está caracterizada.

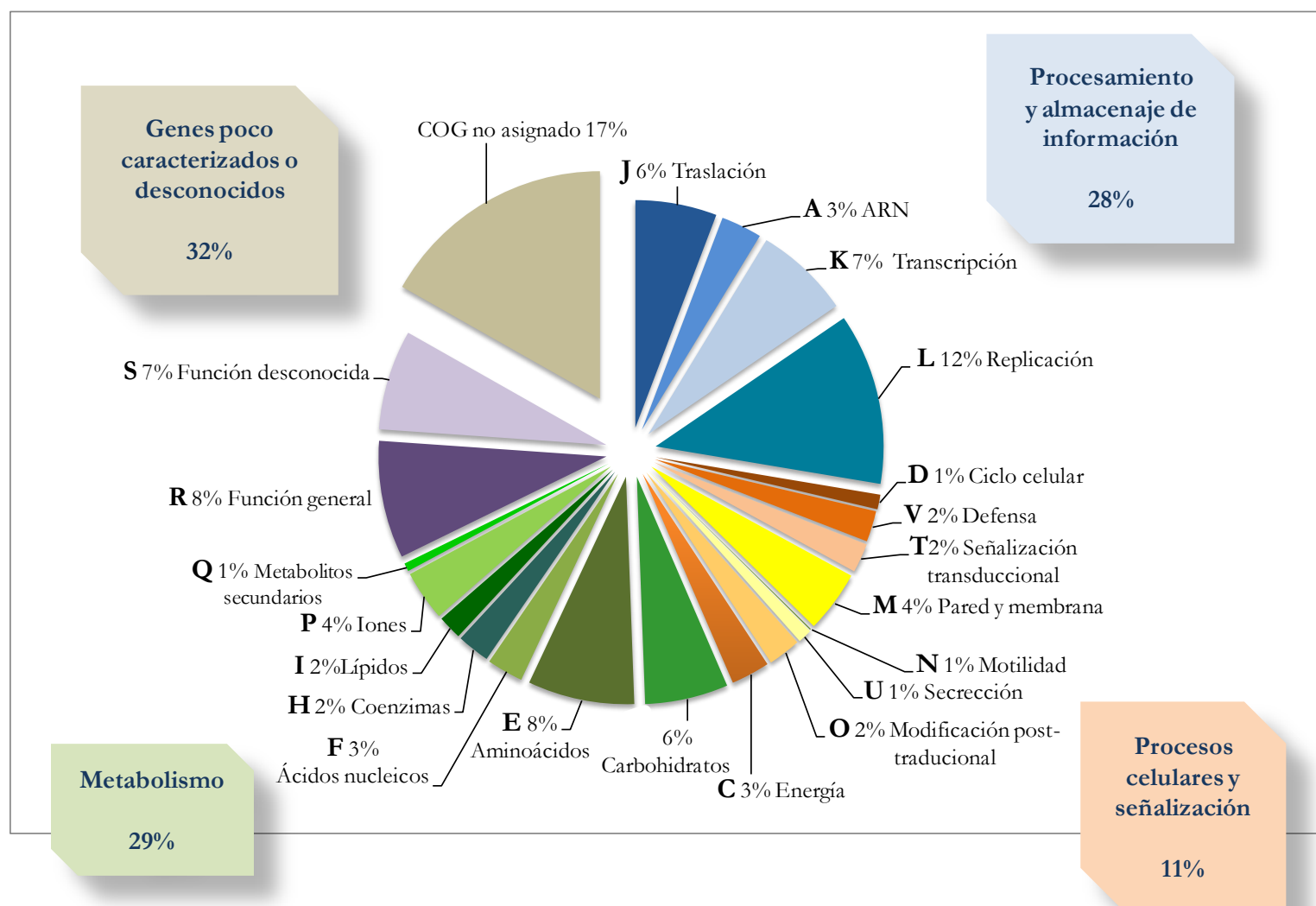
En la figura 36 se representa el genoma completo de la cepa número 78 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* resistente a vancomicina secuenciada que posee un tamaño de 2,6 Mb. Al compararla con las secuencias de otras cepas descritas anteriormente, como *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC BAA-2069, ATCC 43133 y UCN34, se puede apreciar que el tamaño de su genoma es mayor y que en la parte final se encuentra una zona más laxa compuesta por transposasas, donde ha tenido lugar la inserción del elemento genético *Tn1546-like*.



**Figura 34.-** Fotografía de la membrana tras la digestión con la enzima de restricción *CeuI* y de las membranas de hibridación con las sondas específicas de productos de PCR *vanA* y 16S ARNr. En la cepa de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* aparece una banda correspondiente con la presencia del gen *vanA* en el mismo lugar donde ya apareció una banda cuando la hibridación de la membrana se realizó con el gen 16S ARNr.



Finalmente realizamos la asignamos la categoría funcional de los genes de nuestra cepa basándonos en la clasificación funcional de los 25 tipos de clusters de ortólogos (COGs) originalmente creada en 1997 por Tatusov y colaboradores (Tatusov y cols., 1997), pero utilizando la base de datos actual disponible en la página del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) (Tatusov y cols., 2003). Esta base de datos cuenta con más de 9.700 genes ortólogos de 66 organismos (bacterias y eucariotas) clasificados en las 25 categorías funcionales. El alineamiento de nuestras secuencias codificantes frente a esta base de datos se realizó utilizando el algoritmo de BLAST (Zhang y cols., 2000; Morgulis y cols., 2008). Los resultados se muestran en la figura 37.



**Figura 37.-** Clasificación funcional de los genes ortólogos (COGs) de la cepa número 78 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.

---

# Discusión

---

“Si cada día coges un puñado de arena, formarás una montaña”

---

Buda

---





## V.- DISCUSIÓN

El objetivo fundamental de esta tesis doctoral ha sido analizar la relación entre el **cáncer colorrectal (CCR)** y la exposición a diferentes microorganismos que pueden formar parte de nuestra microbiota gastrointestinal. El principal agente estudiado ha sido ***Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus***, aunque también nos ha interesado conocer la posible influencia de ***Helicobacter pylori***, agente implicado en el cáncer gástrico, y ***Salmonella Typhimurium***. Para desarrollar este objetivo, se ha optimizado un nuevo esquema de **Serología Múltiple** basado en la tecnología **Luminex** y que ha sido estudiado en una amplia colección de sueros de pacientes con CCR y de controles sanos pareados pertenecientes a la acción estratégica transversal para el estudio del cáncer, **MCC-Spain** (CIBERESP, Instituto Carlos III). Posteriormente, y aplicando las herramientas moleculares, se ha reclasificado acorde con la **taxonomía actual** una colección de aislados clínicos inicialmente tipados como *Streptococcus bovis*, buscando asociaciones específicas entre las diferentes subespecie y los cuadros clínicos que han producido. También se ha comparado las **características microbiológicas** y la **sensibilidad antibiótica** de esta colección de aislados clínicos con las de una colección de aislados de *S. gallolyticus subsp. gallolyticus* de **origen animal**. En una cepa aislada de un ternero se ha detectado resistencia a los glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina) y se ha estudiado su genoma completo mediante **secuenciación masiva**. En este aislado se ha identificándose un trasposon *Tn1546-like* que vehiculiza el gen *vanA* responsable de la resistencia a glucopéptidos.

En la actualidad hay pocas referencias bibliográficas sobre la asociación de CCR y microorganismos potencialmente carcinogénicos. En una de las revisiones recientemente publicada (Tjalsma y cols., 2012), se ha propuesto un nuevo modelo denominado “bacterial driver-passenger model”, que plantea como primer paso la actuación de ciertas bacterias, denominadas “bacterial drivers”, con características pro-carcinogénicas, que contribuyen al desarrollo del cáncer. Posteriormente y debido al propio proceso cancerígeno se produce una alteración de ese nicho bacteriano, lo cual favorece la aparición y proliferación de un segundo grupo de bacterias, conocidas ahora como “bacterial passengers” y que cobran una mayor relevancia en la fase final del CCR. Una de las características de estas “bacterial drivers” es su capacidad de producir daño a nivel del ADN de la célula eucariota (Boleij y Tjalsma, 2012). Algunos ejemplos pueden ser: la producción por parte de ciertas cepas de *Escherichia coli* de toxinas como la colibactina (Cuevas-Ramos y cols., 2010); la producción del anión superóxido extracelular en *Enterococcus faecalis*, que cuando se convierte a peróxido de hidrogeno, es capaz de causar daño en las células epiteliales de la mucosa colónica (Wang y Huycke, 2007); o el efecto genotóxico que posee *Bacteroides fragilis* (Toprak y cols., 2006), que no sólo actúa directamente sobre la mucosa epitelial sino que es capaz de aumentar la expresión de IL-17 (Wu y cols., 2009). Muchas enterobacterias (por ejemplo de los géneros *Shigella*, *Citrobacter* y *Salmonella*) son potenciales productoras de toxinas (Nougayrède y cols., 2006) contribuyendo a la acumulación de mutaciones propias de la secuencia adenoma-carcinoma (Vogelstein y Kinzler, 1993).

De esta manera, estas bacterias causarían una inflamación persistente que contribuiría al inicio de las lesiones pre-malignas. La evolución del proceso daría lugar a un cambio microambiental, con adversas condiciones para las “bacterials drivers”, favoreciéndose así su

desplazamiento por las ahora denominadas “bacterial passengers” (*Fusobacterium* spp. y *Streptococcus* spp.) y sobrecrecimiento de las mismas. Sin embargo, no está todavía claro cómo el sobrecrecimiento de estas bacterias puede verse favorecido por el cambio existente en la mucosa colónica o qué papel juegan en la progresión del cáncer (Kostic y cols., 2011; Marchesi y cols., 2011). Esta teoría está basada en el conocimiento generado a partir de los sistemas de secuenciación masiva, detectando importantes diferencias entre la microbiota de individuos sanos y la de pacientes con CCR (Marchesi y cols., 2011). Esta idea también está estrechamente relacionada con el hecho de que determinadas enterobacterias potencialmente patógenas rara vez se encuentran en el tracto gastrointestinal de personas sanas (Quin y cols., 2010), mientras que existe una sobrerrepresentación de las mismas en la mucosa colónica de pacientes con CCR (Ahmed y cols., 2007).

Como consecuencia del interés suscitado por esta teoría, esta tesis se ha centrado en el estudio de la asociación de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *H. pylori* y *S. Typhimurium* y el CCR. Aunque, inicialmente, *H. pylori* no estaba incluido en nuestro esquema de estudio, se decidió incorporarlo ya que es un agente bacteriano con un efecto carcinogénico demostrado y se disponía de la tecnología necesaria para realizar un estudio serológico con la plataforma de sueros de la acción transversal MCC-Spain para el estudio del cáncer.

Según el modelo anteriormente descrito, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* formaría parte de los microorganismos llamados “bacterial passengers”, ya que se aísla frecuentemente en pacientes que ya han sido diagnosticados de CCR. Se hace necesario el desarrollo de una herramienta adecuada que sirva como nexo de unión para el estudio entre la infección/colonización por esta bacteria y el CCR; sin embargo, las evidencias sero-epidemiológicas y los estudios realizados en este campo, son hasta el momento escasos (Tjalsma y cols., 2012). Nuestro trabajo es el primero realizado con un número tan elevado de sueros.

Con respecto a la asociación entre *H. pylori* y CCR, actualmente los trabajos realizados dan importancia, entre otros factores, a la producción de gastrina, hormona que induce la secreción de HCl y estimula la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Kountouras y cols., 2008). Esta hiperproducción produce cambios en el ambiente que se ven favorecidas por los propios mecanismos de virulencia de *H. pylori* facilitando su persistencia a nivel gástrico (Burnett-Hartman y cols., 2008; Zhang y cols., 2012; Song y cols., 2013). Aunque este hecho ha sido sugerido en varios trabajos (Thorburn y cols., 1998; Strofilas y cols., 2012; D’Onghia y cols., 2007), no en todos ellos existe asociación significativa.

Por último, hemos introducido en nuestro estudio a *S. Typhimurium*, propuesta por Tjalsma y colaboradores como “bacterial drivers” que se encuentra también relacionada directamente con el incremento del riesgo de CCR, junto con el consumo de tabaco y el nivel elevado de hierro. En estadios iniciales de pacientes con CCR, se han detectado niveles elevados de anticuerpos frente a *S. Typhimurium* (Kato y cols., 2013), identificándose también este microorganismo en el tejido adyacente de lesiones cancerosas (Marchesi y cols., 2011).

En el caso de *S. boris*/*S. galloyticus* subsp. *galloyticus*, su asociación con el CCR es conocida desde hace tiempo (Boleij y cols., 2013; Abdulmir y cols., 2011). Uno de los objetivos principales de esta tesis doctoral fue, iniciar el desarrollo y puesta a punto de un nuevo esquema basado en la tecnología Luminex con proteínas de *S. galloyticus* subsp. *galloyticus*. Para ello se trabajó inicialmente con el extracto procedente de la lisis de las proteínas de membrana. Como se obtuvo una muy baja especificidad, se decidió utilizar una nueva estrategia probando de nuevo con proteínas purificadas. Estas proteínas habían sido previamente caracterizadas por el grupo del Dr. Tjalsma en Holanda, demostrando en un trabajo previo su asociación con el CCR (Boleij y cols., 2012). Estas proteínas forman parte de proteínas ancladas en el peptidoglicano formando el pili (Telford y cols., 2006). Las proteínas Gallo2178 (pilus principal) y Gallo2179 (adhesina de unión a colágeno) están codificadas juntas en el operón *pil1*, participan en procesos de formación de biofilm y confieren una mayor virulencia en modelos experimentales de endocarditis en ratón (comunicación personal del Dr. Tjalsma). Las otras dos proteínas elegidas son Gallo1569 y Gallo2039 que están codificadas en los operones *pil2* y *pil3*, respectivamente.

La Serología Múltiple es una herramienta de gran utilidad epidemiológica para el estudio de la respuesta inmunitaria. Se basa en la combinación de proteínas recombinantes modificadas específicamente y permite desarrollar simultáneamente estudios sero-epidemiológicos frente a un número elevado de antígenos (Waterboer y cols., 2005). La detección, cuantificación y evaluación de la respuesta de forma conjunta, permite identificar buenos marcadores serológicos, aunque generalmente es necesario una compleja puesta a punto de la técnica para poder detectar aquellas proteínas con un mayor poder inmunogénico (Gao y cols., 2009). Esta técnica se ha empleado con anterioridad en varios estudios relacionados con el virus del papiloma humano (VPH) y de *H. pylori* y el riesgo de padecer cáncer de cérvix y gástrico, respectivamente (Waterboer y cols., 2005; Gao y cols., 2009; Michael y cols., 2009). El último trabajo realizado por el grupo del Dr. Pawlita está relacionado con *H. pylori* y el riesgo de sufrir CCR (Epplein y cols., 2013).

El trabajo incluido en esta Tesis Doctoral es el primer estudio serológico realizado en nuestro país que permite, tanto por el número de sueros analizados como por la tecnología empleada, analizar la exposición a los agentes infecciosos *S. galloyticus* subsp. *galloyticus*, *S. Typhimurim* y *H. pylori* en relación con el CCR. Su desarrollo ha sido posible gracias a la plataforma MCC-Spain del CIBERESP. En el caso de *S. galloyticus* subsp. *galloyticus* y *S. Typhimurim*, no se había puesto a punto el esquema de Serología Múltiple con Luminex, pero se disponía de proteínas purificadas que se unieron directamente a las microesferas de poliestireno SeroMap. A su vez, también se ha realizado la evaluación de la respuesta inmunológica frente *H. pylori* en esta misma población, contándose para ello con un total de 15 proteínas específicas previamente descritas y utilizadas en otros estudios ya validados (Michael y cols., 2009).

En una primera aproximación se unió directamente el producto de la lisis de las proteínas de membrana de *S. galloyticus* subsp. *galloyticus*, *S. pasteurianus* y *S. infantarius* a las microesferas de poliestireno. Los datos de la Intensidad Media de la Fluorescencia obtenidos fueron confusos, observándose una posible reacción cruzada que podría explicarse por lo estrechamente relacionadas que están estas especies (Schleger y cols., 2003). Es por ello que

se necesitan proteínas de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* que permitan una mayor especificidad en la detección. El estudio serológico de Abdulmir y colaboradores, también realizado con el producto de la lisis de la extracción de proteínas de membrana procedentes de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, ha sido el primero de estas características donde se han analizado 50 casos de adenocarcinoma primario, sin haber recibido ningún tratamiento previo; 14 casos de CCR, a los cuales ya se les había realizado una colonoscopia previamente y eliminado los pólipos existentes; y 30 controles, pareados por sexo y edad. En ese trabajo detectaron niveles elevados de anticuerpos IgG frente a esta bacteria tanto en los pacientes con CCR, como en aquellos con adenocarcinoma primario (Abdulmir y cols., 2009).

Gracias a la secuenciación del genoma completo de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, se conocen en mayor detalle factores de virulencia, proteínas reguladoras, sistemas de transporte, proteínas de superficie, etc. que podrían ser candidatos a utilizar en posteriores ensayos (Hinse y cols., 2011). Otro de los datos que hay que tener en cuenta es que *S. bovis* forma parte de la microbiota intestinal habitual de algunos animales y se encuentra en aproximadamente el 10% de los humanos (Osawa y cols., 1995) por lo que es difícil valorar los datos obtenidos con la serología. Como con otros microorganismos, sería interesante diferenciar biomarcadores de infección y de colonización.

Tras lo expuesto anteriormente, se decidió emplear las proteínas purificadas Gallo1569, Gallo2039, Gallo2178 y Gallo2179, previamente validadas en un ensayo tipo ELISA según su sensibilidad y especificidad (Bolej y cols., 2011). La respuesta más alta fue para Gallo2039 seguida de Gallo2179 y Gallo1569, mientras que Gallo2178 presentó el valor más bajo. Estos resultados reproducen lo observado en el trabajo realizado por Bolej y colaboradores, donde se determinó el nivel de anticuerpos de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* en el suero de pacientes que presentaban bacteriemias por *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. Typhimurium* y *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (Bolej y cols., 2012). De las cuatro proteínas analizadas, Gallo1569 es la que genéticamente menos conservada está (Rusniok y cols., 2010), hecho que podría explicar sus valores tan bajos de la Intensidad Media de la Fluorescencia. Sin embargo, para esta proteína no fue posible establecer un punto de corte estadísticamente significativo y no se tuvo en consideración para el análisis de los datos serológicos obtenidos. La proteína Gallo2039, por el contrario, puede encontrarse en varias especies relacionadas, lo que justifica su baja especificidad y sus valores tan elevados tanto en casos como en controles. Por último, Gallo2178 y Gallo2179 están codificadas en el mismo operón (*pilI*). Se sabe que este operón es un factor de virulencia implicado en la endocarditis (Bolej y col., 2011) y está compuesto por la proteína Gallo2178, como la subunidad mayor del pilus, Gallo2177 responsable de la polimerización de las subunidades y Gallo2179 que contiene un dominio de unión al colágeno. Este dominio se une fuertemente al colágeno tipo IV y está implicado en el daño de las válvulas del corazón y como consecuencia secundaria, a la mucosa colónica (Danne y cols., 2011).

Se observó una asociación significativa para las proteínas Gallo2039 y Gallo2178 con el sexo masculino y para Gallo2179 en las mujeres. Una posible explicación podría ser reacciones cruzadas con otras especies de estreptococos, como por ejemplo *S. infantarius* que también puede expresar la proteína Gallo2039, aunque no se deberían descartar componentes hormonales en el desencadenamiento del CCR. La influencia del sexo en las

características clínicas y patológicas del CCR cada vez se está teniendo más en consideración. Existen trabajos recientes en este sentido relacionados con la biología molecular del cáncer gástrico y colorrectal que han conducido a una mayor comprensión del efecto de los estrógenos en la carcinogénesis. Se ha visto que los estrógenos tienen un efecto potencialmente protector contra el desarrollo del CCR (Wilkins y cols., 2010) y que pueden ser la causa de un mejor pronóstico en mujeres premenopáusicas (Koo y cols., 2008). Asimismo, se ha observado que en mujeres con terapia de reemplazo hormonal tienen un riesgo disminuido de cáncer gástrico y colorrectal (Green y cols., 2012). Estos resultados indican que los estrógenos tienen un efecto protector frente al crecimiento celular en el CCR, al menos en parte, por la supresión de dos proto-oncogenes: *c-myc* y *bcl-2* (Wilkins y cols., 2010). Aunque todavía no se conoce exactamente el mecanismo, ser consciente de las diferencias existentes en el tratamiento entre ambos sexos podría conducir a una distribución más equitativa de los recursos sanitarios (Koo y cols., 2008).

Con respecto a la edad, en el grupo control no se observó ninguna diferencia, pero sí se observó mayor reactividad en las personas de mayor edad. Se detectó una asociación significativa entre la respuesta a la proteína Gallo2179 y el grupo de menor edad. Nuestras limitaciones nos llevan a describir sólo lo obtenido en nuestro trabajo, ya que al tratarse del primer estudio realizado de estas características, no podemos comparar nuestros resultados con ningún otro trabajo que se haya realizado previamente. En general, nuestros datos muestran unos resultados en concordancia con lo observado mediante ELISA por el grupo de Boleij, aunque con una mayor resolución de los resultados y con pequeñas discrepancias, para las proteínas Gallo2039 and Gallo2178.

El siguiente análisis realizado fue con respecto a la distribución geográfica, donde la respuesta a la proteína Gallo2039 fue significativamente diferente en los casos y controles de las muestras de León, Asturias y Huelva; mientras que en el caso de la proteína Gallo2178, fueron entre Barcelona, Guipúzcoa, Murcia y Valencia. Para la proteína Gallo2179 no se observaron diferencias entre los municipios. En cierto sentido, nuestros datos estarían en sintonía con lo descrito previamente, ya que se observa una mayor diferencia entre los municipios más grandes como ya ha sido descrito (López-Abente y cols., 2006).

Por último, debemos puntualizar que para poder definir a un suero como positivo frente a *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, y teniendo en cuenta que la proteína Gallo1569 incluida en nuestro estudio no ha resultado ser de utilidad, se hace necesario la inclusión de un número mayor de proteínas específicas. Esto ha sido realizado de igual modo con *H. pylori*, donde se ha establecido que para considerar un suero positivo se necesita una respuesta positiva al menos a 4 de las 15 proteínas específicas que se emplean en el estudio de este microorganismo (Pawlita y cols., 2009).

Con respecto a *H. pylori*, existe una mayor seroprevalencia en los hombres mayores de 65 años, mientras que en la población femenina no se aprecia ninguna diferencia entre los casos y los controles. La Serología Múltiple ha resultado ser una herramienta más sensible que la determinación realizada mediante el ensayo tipo ELISA. Recientemente ha sido publicado el primer trabajo sero-epidemiológico que estudia la asociación entre el CCR y *H. pylori*, evaluando la respuesta inmunológica frente a 15 proteínas específicas, incluidas CagA y VacA (Epplen y col., 2013). Este trabajo ha sido desarrollado por el grupo del Dr. Pawlita, con el



que se colaboró para la implantación de nuestro esquema serológico. En general, los datos presentados muestran unos resultados poco significativos pero que sugieren que existe una asociación entre *H. pylori* y CCR, la cual es atribuida principalmente a la presencia de VacA (Epplein y cols., 2013). La elevación de VacA podría estar asociada a la producción de gastrina, atrofia gástrica y expresión de COX-2, sin embargo, la presencia de niveles tan elevados de anticuerpos frente a VacA también podría ser un indicador de un factor diferente subyacente que todavía no se ha valorado el estado de inflamación basal del huésped (Janulaityte-Gunther y cols., 2007). Curiosamente, en el estudio de Epplein se encontró una asociación nula entre CagA y CCR, planteándose que el posible riesgo pueda deberse a las diferentes isoformas de las cepas CagA-positivas (por ejemplo, según los distintos motivos EPIYA) como ya ha sido estudiado en el caso del cáncer gástrico (De Sablet y cols., 2011; Sicinschi y cols., 2010). Debido a la elevada prevalencia de *H. pylori* en la población, cerca del 50% en España, la posible relación causal propuesta tiene que ser explorada más profundamente. Sin embargo, los trabajos que se centran en el estudio de la relación entre *H. pylori*-positivo y el CCR son escasos e incongruentes. Zhang y colaboradores han llevado a cabo otro estudio de casos y controles para el estudio de esta asociación, centrándose, fundamentalmente, en los factores de virulencia de *H. pylori*, así como en la edad, sexo, anatomía patológica y estadio del cáncer (Zhan y cols., 2011). Han observado que la asociación es mayor en con la edad, mientras que la diferencia entre ambos sexos es mínima; hecho que está en sintonía con otro estudio realizado previamente (Seher y cols., 2000). También sugieren que, a pesar de las limitaciones, la infección por *H. pylori* puede estar, en cierto sentido, asociada con el riesgo de sufrir CCR, principalmente en una determinada zona y siendo esta asociación mayor en el estadio inicial del cáncer (Zhan y cols., 2011).

La proteína FliC de *S. Typhimurium* ya había sido previamente validada en un ensayo tipo ELISA (Kato y cols., 2013), por eso fue elegida para la inclusión en el esquema de serología para el estudio de la respuesta inmunitaria. Observamos que nuestros resultados mostraron una reactividad más baja que la de los sueros de referencia o control. Aunque, en general, los resultados observados fueron muy similares, la respuesta inmunitaria obtenida para *S. Typhimurium* tanto para los casos como para los controles fue menos pronunciada mediante Serología Múltiple que mediante la obtenida por el ensayo tipo ELISA (Kato y cols., 2013). Esto podría estar relacionado con aspectos metodológicos, o podría tener que ver con el incremento de la edad en la población estudiada; en nuestro estudio los sueros de la población española, a diferencia de la población estudiada previamente por ELISA, procedente de Detroit y de los Países Bajos. En nuestro caso, aunque la asociación fue débilmente significativa, observamos una mayor respuesta a la proteína FliC de *S. Typhimurium* en la población de mayor edad. Este dato estaría en relación con lo descrito previamente (Ren y col., 2009), ya que está demostrado que los hospedadores de mayor edad tienen una probabilidad más elevada de sufrir infecciones (Pinner y cols., 1996; Han y cols., 2000; Yoshikawa, 2000; Alegre y cols., 2006). Ren y colaboradores, demostraron que aquellos ratones más viejos infectados por *S. Typhimurium* presentaban una carga bacteriana mayor, así como una pérdida de peso más pronunciada que los ratones más jóvenes. También, la incapacidad de producir IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  como respuesta a la infección por *S. Typhimurium*, podría ser una de las posibles causas (Ren y cols., 2009). Kato y colaboradores, también evaluaron la respuesta frente a la proteína FliC en relación al consumo de tabaco y con la ingesta de hierro y, curiosamente, la asociación con el CCR fue mayor en personas con

pólipos que en aquellas con cáncer establecido. Es por esto, por lo que se ha planteado la utilidad de usar este marcador serológico en estadios iniciales de cáncer (Kato y cols., 2013).

A pesar del papel tan importante de nuestra microbiota, los continuos cambios a los que se ve sometida pueden promover un microclima que acaba causando daño celular a nivel de la mucosa colónica (Parsonnet, 1995). Nuestro papel para la identificación de las especies bacterianas que participan en este proceso y poder elucidar así, los mecanismos y/o factores que contribuyen al desarrollo del CCR, se hace cada vez más difícil. Esto es debido fundamentalmente a que el tracto gastrointestinal está colonizado por numerosas especies de bacterias, muchas de las cuales aún no han sido identificadas. Muchas de ellas podrían tener una persistencia limitada y podrían haber desaparecido años antes de que se diagnostique el proceso cancerígeno (Bik y cols., 2006; Eckburg y cols., 2005). Creemos que es importante centrarse en la identificación de las especies bacterianas que, en conjunto, puedan contribuir activamente en el desarrollo del CCR, así como en el estudio de otros factores, incluyendo el hospedador y factores ambientales. Por todo esto, buscar nuevos marcadores con reactividad específica y apropiada que nos ayuden a la detección precoz de procesos cancerígenos es complicado, y más teniendo en cuenta que probablemente muchas de las especies que forman parte de la microbiota poseen proteínas similares o están genéticamente relacionadas.

En una segunda etapa nos planteamos realizar una adecuada reclasificación taxonómica de los aislados obtenidos por bacteriemias en pacientes atendidos en el Hospital Ramón y Cajal durante 2003-2010, para posteriormente implantar este nuevo sistema taxonómico en nuestro hospital. La importancia de la correcta identificación se debe a las implicaciones clínicas que se han asociado a las diferentes subespecies. Para llevar a cabo esta reclasificación, nos hemos basado en los diferentes métodos de identificación descritos hasta la fecha, estudiando la diversidad genética mediante la secuenciación de un fragmento del gen *sodA*, descrito como la mejor diana de identificación (Poyart y cols., 2002); la secuenciación del gen 16sARNr (Schlegel y cols., 2003); y el recientemente introducido MALDI-TOF MS, basado en la espectrometría de masas (Hinse y cols., 2011).

Las subespecies mas relevantes en clínica agrupadas dentro del complejo *S. bovis* son *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, antes conocido como *S. bovis* biotipo I, y *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, conocido como *S. bovis* biotipo II/2, estrechamente relacionadas genéticamente; y *S. lutetiensis*, también llamado *S. infantarius* subsp. *coli* por algunos autores (Beck y cols., 2008) y antes conocido como *S. bovis* biotipo II/1 (Hinse y cols., 2011).

La asociación entre la bacteriemia y/o endocarditis por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y la existencia oculta de un CCR (Boleij y cols., 2009; Gupta y cols., 2010), hace necesaria la recomendación clínica de buscar activamente la existencia de adenocarcinomas de colon cuando se detecta una la infección por este microorganismo. También se ha reflejado la asociación entre la infección por *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* y las patologías hepatobiliares (Corredoira y cols., 2013; Lazarovitch y cols., 2013; Su y cols., 2013).

En la presente tesis, la mitad de los sujetos presentaron alteraciones hepatobiliares, mientras que, las enfermedades cardiovasculares o endocarditis, sólo fueron observadas en 11,7% y 17,6% de los pacientes, respectivamente. La observación de pólipos en la mucosa colónica y la presencia de carcinoma de colon se correspondieron con el 11,7% y el 8% de



los pacientes, respectivamente. Cuando sólo fueron considerados aquellos pacientes que presentaron bacteriemia por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (n=14), se observó que 7 de ellos (50%) se asociaron a procesos cancerígenos, aunque no todos ellos fueron exclusivamente relacionados con el tracto gastrointestinal (linfomas, leucemia o cáncer de próstata). El hecho es que el binomio, infección por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y CCR, sugerirían una alteración a nivel epitelial que le permitiera el paso a través de la pared intestinal. Estudios *in vitro* han revelado que esta bacteria no es capaz de invadir las células del epitelio intestinal; sin embargo, podría darse un proceso de traslocación con una eficiencia mayor que en otras especies y/o subespecies (Boleij y cols., 2011). Por el momento no se ha publicado ningún trabajo que estudie la traslocación de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, pero no cabe duda que esta posibilidad convierte a los pacientes con CCR en un grupo de riesgo (Soler y cols., 1999).

Clásicamente se ha recomendado el estudio complementario mediante colonoscopia a los pacientes con bacteriemia y/o endocarditis por *S. bovis* para descartar procesos cancerígenos gastrointestinales, incluyendo una prueba colónica, un estudio hepático para descartar cirrosis y un estudio digestivo superior o área biliopancreática para descartar neoplasia a este nivel (Ruoff y cols., 1989; Corredoira y cols., 2005, Vergara-López y cols., 2011). También puede estar indicado la realización de un ecocardiograma ya que un alto porcentaje de estos pacientes sufrirán endocarditis (Corredoira y cols., 2008; Fernández-Ruiz y cols., 2010). Si en los hemocultivos se aísla *S. pasteurianus* o *S. lutetiensis*, en aproximadamente la mitad de los casos habrá una cirrosis o una infección del tracto biliar asociada (Ruoff y cols., 1989; Lee y cols., 2003; Corredoira y cols., 2008). En el caso de que los pacientes presenten cirrosis, dado que suelen ser estadios avanzados (Vergara-López y cols., 2011), serían fácilmente diagnosticables por su historia, exploración y analítica. Para las infecciones del tracto biliar una ecografía más la analítica, ofrece generalmente mucha información. En algunos casos puede ser necesario estudios más complejos como la colangiografía endoscópica o la gastroscopia (Corredoira y cols., 2008). Aunque estas pruebas generan un gasto importante y no están exentas de riesgo para el paciente, las neoplasias distintas de la neoplasia de colon, suelen preceder a la bacteriemia, a diferencia de las neoplasias de colon, que suelen diagnosticarse simultáneamente (Vergara-López y cols., 2011). En nuestra opinión se hace fundamental, en los laboratorios de Microbiología, una adecuada identificación a nivel de subespecie de los aislados de *S. bovis* ya que aporta información esencial en el estudio de este tipo de infecciones y de la presencia de la enfermedad subyacente. De igual manera, se necesita optimizar los protocolos de actuación clínica con estos pacientes para un mejor diagnóstico y tratamiento, también se necesita implementar la identificación molecular mediante secuenciación del gen *sodA* para elucidar la subespecie bacteriana.

La endocarditis por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* está asociada con el sexo masculino y una edad avanzada (Corredoira y cols., 2008; Poyart y cols., 2002). En nuestra serie, el 55% fueron hombres con una edad alrededor de 70 años. Sin embargo, sólo el 17% de los pacientes presentaron un cuadro de endocarditis. Estos datos estarían en consonancia con lo descrito recientemente por otro grupo (Fernández-Ruiz y cols., 2010).

Durante el periodo de nuestro estudio (Enero 2003-Enero 2010), se procesaron un total de 76.089 muestras de sangre en nuestro laboratorio, siendo 6.935 (9,1%) positivos, y

solamente 52 de ellos identificados como *S. bovis* (0,74%). Tras la identificación mediante métodos moleculares únicamente 45 de los aislados resultaron ser *S. bovis* (0,64%). A su vez, durante este mismo periodo de estudio, 270 casos de endocarditis de etiología infecciosa fueron diagnosticados en el Hospital Universitario Ramón y Cajal, correspondiéndose principalmente con *Staphylococcus aureus* (30,7%), *Staphylococcus* coagulasa-negativo (17,4%), y *Enterococcus* spp. (13,3%). Sólo 7 de los casos se correspondieron con *S. bovis* (6 aislados fueron por *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, mientras que 1 fue por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*), representando el 2,6% de todos los casos de endocarditis (Navas y cols., resultados sin publicar).

Sorprendentemente, de todos los aislados incluidos en nuestro estudio, 4 de ellos se correspondieron con *Leuconostoc mesenteroides* y 3 con *Lactococcus lactis* que previamente habían sido identificados como *S. bovis* por el sistema de identificación semi-automático usado habitualmente durante el periodo de estudio (sistemas PASCO y WiDER) para la identificación de microorganismos por nuestro hospital. Según lo observado en nuestro estudio, este hecho podría deberse a la baja reactividad bioquímica mostrada por *S. bovis*, lo que conllevaría a una inadecuada identificación, siendo necesarias 48 horas de incubación de los paneles de lectura para la obtención de un resultado adecuado. Otro de los factores a tener en cuenta es que mediante la técnica de aglutinación para el antígeno D de Lancefield, en los aislados correspondientes a *Leuconostoc* y *Lactococcus* la aglutinación fue positiva, circunstancia que reafirmó en su momento la identificación errónea inicialmente realizada. A pesar de que este hecho no se ha registrado en la bibliografía, si ha sido observado en *Pediococcus* spp. (Murray y cols., 2003).

Del mismo modo que ha sido descrito en otros trabajos (Hoshino y cols., 2005; Sasaki y cols., 2004), nosotros también hemos detectado diferencias en la identificación de *S. bovis* mediante los dos métodos de secuenciación usados, el 16S rARN y el gen *sodA*. De igual forma, encontramos que el método más adecuado para una correcta identificación de las diferentes especies del grupo *S. bovis* es la secuenciación nucleotídica de un fragmento interno del gen *sodA*. Otro de los métodos empleados recientemente es el sistema MALDI-TOF MS, basado en la espectrometría de masas. A pesar de los últimos datos presentados (Hinse y cols., 2011), en nuestra experiencia esta tecnología todavía no está lo suficientemente desarrollada para identificar adecuadamente las especies y subespecies de *Streptococcus* spp., especialmente en lo que se refiere a *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. Esta circunstancia, común a lo observado con *S. pneumoniae* y los estreptococos del grupo viridans para los que el sistema MALDI-TOF MS, no supone un avance en su identificación y aunque los primeros estudios fueron prometedores (Rupf y cols., 2005; Friedrichs y cols., 2007), existen problemas de discriminación (Risch y cols., 2010; Welke y cols., 2011). No obstante, recientemente Ikryannikova y colaboradores han planteado la aplicación de algoritmos alternativos a los análisis convencionales de los espectros de masas. Según este trabajo existen un número de pequeños picos que permiten discriminar *S. pneumoniae* de *S. mitis* que ha resultado ser más fructífero ya que se centran en recopilar las diferencias entre estos picos (Ikryannikova y cols., 2012). Con respecto a los resultados obtenidos por el sistema API 20 Strep, podemos decir que están en concordancia con los datos obtenidos mediante la secuenciación con el gen *sodA*, aunque para 5 aislados, correspondientes a *S. lutetiensis*, la identificación fue errónea (perfil mostrado: *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*). A pesar de esto, este método puede resultar

de gran utilidad para la identificación de las principales especies de *S. bovis*. Sin embargo, desde un punto de vista tanto clínico como epidemiológico la secuenciación del gen *sodA* sería en la actualidad el método más adecuado para llegar a una adecuada identificación.

A pesar de los múltiples estudios realizados en referencia a los cambios existente dentro del grupo *S. bovis*, son escasos los estudios relacionados con la diversidad genética y todos ellos utilizan el PFGE como método de referencia (Tripodi y cols., 2005; Wang y cols., 1999; Mühlemann y cols., 1999). La herramienta molecular Multi Locus Sequence Typing (MLST) todavía no ha sido aplicada al estudio de la estructura poblacional de *S. bovis*. El análisis de los perfiles de PFGE permitió agrupar la colección de aislados clínicos y diferenciarla claramente de la colección de aislados de origen animal. Este hecho apuntaría a que las líneas genéticas de ambos ecosistemas son diferentes, y quizás existan linajes plenamente adaptados a los diferentes hospedadores, y por ello los linajes genéticos asociados al hombre sean diferentes de aquellos adaptados a los animales. En este sentido, se ha realizado algún trabajo con el objetivo de buscar alguna diferencia entre los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* de procedencia clínica frente a otros orígenes no clínicos sin ningún éxito. Lo que implica que no necesariamente el hecho de que esta bacteria forme parte de la microbiota humana y del rumen de animales sea considerado como potencialmente patógeno (Sasaki y cols., 2004). Como ya se ha demostrado, los aislados procedentes de la clínica muestran un marcador de expresión del antígeno humano de Lewis (sLe<sup>x</sup>) en la superficie de su pared, a diferencia de lo observado en aislados procedentes de las heces (Hirota y cols., 1996). Este antígeno normalmente se expresa en la superficie de los leucocitos humanos y actúa como ligando con la E-selectina expresada en el endotelio, incluso se ha visto en la superficie de las células cancerosas en el cáncer de colon. Si tenemos en cuenta este hecho, la adhesión a las células endoteliales humanas de las cepas de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* que presenten este antígeno, sería mayor. Este hallazgo se puede convertir en un elemento muy importante para diferenciar las cepas patogénicas de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, aunque por supuesto son necesarios un mayor número de estudios que apoyen esta observación. Por otra parte, *H. pylori* es otro de los microorganismos que también presenta este antígeno en su superficie como sistema de adaptación al epitelio gástrico y evasión de la respuesta inmune (Sherburne y Taylor, 1995; Moran y cols., 1996; Negrini y cols., 1996). En *H. pylori* la expresión de este antígeno está relacionado con la distribución geográfica del hospedador. Es decir, los antígenos de Lewis tipo 2 (Le<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup>) predominan en Europa y en América del Norte y se expresan en aproximadamente el 85% de las cepas (Simoons-Smit y cols., 1996); mientras que los de tipo 1 (Le<sup>a</sup> y Le<sup>b</sup>) predominan fundamentalmente en Asia y en América del Sur, expresándose en menos del 5% de las cepas (Wirth y cols., 1996).

A causa del tratamiento antibiótico, el tracto gastrointestinal humano y el rumen de los animales están considerados como uno de los reservorios mejor conocidos para la transmisión de genes de resistencia (Salysers y cols., 2004). Esta transferencia entre diferentes especies y/o géneros entre bacterias es frecuente, y en *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* se ve muy favorecida, en particular, por su capacidad de formar biofilms (Mathur y cols., 2005). Los tratamientos intensivos, como por ejemplo con tetraciclina en la agricultura animal, o la adicción de antibióticos en los piensos animales como promotores del crecimiento podrían ser causa de la adquisición y mantenimiento de estos genes de resistencia a los antibióticos (van der Bogaard y cols., 2000; Chopra y Roberts, 2001).

En general los aislados de *S. bovis* son muy sensibles a los antimicrobianos usados habitualmente en clínica humana. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* es la subespecie que mayores porcentajes de resistencia presenta, siendo por el contrario *S. lutetiensis* la más sensible. Leclercq y colaboradores publicaron un trabajo comunicando porcentajes de resistencia a las tetraciclinas (78%), los macrólidos (59%), la clindamicina (50%), la estreptomicina y la kanamicina (~35%) (Leclercq y cols., 2005). También se han encontrado resistencias a eritromicina (45,6%), clindamicina (27,7%) y telitromicina (4%) en otro trabajo realizado en nuestro país (Rodríguez-Avial y cols., 2005). Centrándonos únicamente en los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* causantes de bacteriemias, los porcentajes de resistencia más elevados son para eritromicina y clindamicina con un 15,5%, seguido de fosfomicina y estreptomicina de alto nivel con un 11,1% para cada una. Si miramos en conjunto los 45 aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, de las distintas procedencias, vemos que los mayores porcentajes de resistencia se observan en los aislados de procedencia animal, con un 17,8% de resistencia para eritromicina, seguido de un 15,5% para clindamicina y de un 13,3% para estreptomicina de alto nivel y fosfomicina.

El fenotipo de resistencia a la eritromicina más frecuente es el MLS<sub>B</sub> que confiere resistencia cruzada a todos los macrólidos con anillos de 14, 15 y 16 átomos, lincosamidas y estreptogramina B. En los estreptococos la resistencia a estos antibióticos, principalmente es debida a la metilación del 23 ARNr por un metiltransferasa codificada por el gen *erm* (metilasa ribosomal de eritromicina) y el fenotipo de resistencia M que se debe a mecanismos de resistencia mediante bombas de expulsión activa codificado por el gen *mef(A)* (bomba de eflujo a macrólidos), en el que se ven afectados los macrólidos de 14 y 15 átomos, pero no los de 16 ni la clindamicina (Leclercq, 2002). En nuestro caso, como hemos mencionado anteriormente, hemos observado que los porcentajes de resistencia mayores los presentan los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* procedentes de los diferentes animales, siendo estas del 15,5% del total de los 45 aislados.

En el caso de la tetraciclina la resistencia puede deberse a dos mecanismos: bombas de expulsión activa [Tet(L) y Tet(K)] y ribosomales [Tet(M), Tet(O)], [Tet(S), y Tet(I)] (Leclercq y cols., 2004). Nosotros hemos encontrado que los valores más elevados de resistencias han sido para los aislados procedentes de colonización humana, siendo esta del 15,5 % del total de todos los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Aunque nosotros no hemos detectado los genes de resistencia implicados, existen trabajos que apuntan al gen *tet(M)* como el gen de resistencia detectado con mayor frecuencia. Este gen es por lo general sumamente frecuente en las bacterias grampositivas resistentes a tetraciclinas y a menudo es asociado con los elementos conjugativos de la familia Tn916 (Clewett y cols., 1995). Para los aislados procedentes de bacteriemias no se pudo detectar los niveles de resistencia a las tetraciclinas.

Nomoto y colaboradores, acaban de publicar un trabajo en el que se estudia la sensibilidad y la distribución de los genes de resistencia implicados en 66 aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* de diferentes orígenes, donde se ha visto que los mayores porcentajes de resistencia fueron para tetraciclinas (56.6%), doxiciclina (68.2%) y lincomicina (77.3%). La resistencia a tetraciclina y doxiciclina fue más prevalente en los aislados procedentes de las muestras clínicas de pacientes humanos, animales enfermos y pollos de corral sanos, mientras que en los mamíferos sanos la prevalencia fue significativamente menor (Nomoto y cols., 2013).

Esto puede ser, probablemente, debido a las diferencias en la cantidad de antibióticos administrados a los animales (por ejemplo, aditivos alimentarios, tratamiento veterinario...).

*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* comparte nicho ecológico con otras bacterias altamente relacionadas como *Enterococcus* y otras especies del género *Streptococcus*. Este hecho conlleva la posibilidad de eventos de transferencia horizontal, tal y como ya ha sido previamente sugerido (Hinse y cols., 2011, Lin y cols., 2011). Sin embargo, la mayor parte de los mecanismos de transferencia e inserción todavía no son bien conocidos (Hacker y cols., 2001; Bellanger y cols., 2009). Aunque este microorganismo suele ser sensible a los glucopéptidos, se han comunicado casos aislados de resistencia. Recientemente, Gómez-Garcés y colaboradores detectaron resistencia tanto a vancomicina como a teicoplanina en un aislado de un hemocultivo de un paciente con bacteriemia (Gómez-Garcés y cols., 2012). Otros casos comunicados de cepas de *S. bovis* que presentan fenotipo de resistencia a glucopéptidos han sido: un caso de resistencia con fenotipo VanB en las heces de un paciente (Poyart y cols., 1997) y 4 aislados procedentes de las heces de un ternero, que presentaron tanto el fenotipo VanA como VanB (Mevius y cols., 1998). En nuestro caso, la cepa número 78 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* con resistencia tanto a vancomicina y teicoplanina (fenotipo VanA), encontrada en un ternero es obviamente el resultado de la adquisición del transposón Tn1546 que ha sido integrado en el cromosoma bacteriano. Este trasposón habría sufrido una delección en su parte final, perdiendo la capacidad de diseminación de la resistencia. Este hecho se pudo comprobar al realizar los experimentos de conjugación.

Debido a las características peculiares de esta cepa nos planteamos secuenciar su genoma completo. Tras los resultados obtenidos, uno de los datos más llamativos fue la gran cantidad de transposasas y secuencias de inserción que posee esta cepa, así como múltiples genes previamente descritos en *S. pneumoniae* o en *S. pyogenes*. También se ha observado cambios importantes en la organización de los genes con respecto a los tres genomas de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* secuenciados por otros grupos de investigación (Rusniok y cols. 2010; Hinse y cols., 2011; Lin y cols., 2011). Hemos comprobado que el genoma de la cepa número 78 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* es considerablemente más grande que los previamente publicados, siendo el tamaño medio del genoma de este microorganismo de 2,3 Mb mientras que nuestro genoma llega a alcanzar un tamaño de 2,6 Mb. El porcentaje de genes codificantes (88,4%) fue muy similar al previamente descrito (86 y 87%). Es necesario realizar un análisis bioinformático más detallado, así como la comparación de nuestra cepa con las previamente secuenciadas para el estudio de posibles características que hacen que esta cepa sea tan peculiar. En este sentido, el siguiente paso sería la circularización del genoma secuenciado para localizar exactamente cada uno de los genes.

En este trabajo hemos pretendido aclarar el papel que podría presentar *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* en el CCR, explorando en primer lugar la respuesta inmunitaria de la población española en la colección de sueros MCC-Spain. Se trata del primer estudio realizado en España empleando la novedosa técnica serológica de Serología Múltiple basada en la tecnología Luminex para valorar la exposición a este microorganismo, pero también a *H. pylori* y *S. Typhimurium*. Aunque los resultados sugieren una asociación de la respuesta serológica a determinadas proteínas, en algunos casos con cierta asociación geográfica, es

necesario ampliar el número de proteínas para una valoración más específica. Por otro lado y basándonos en nuestros resultados y en trabajos recientemente publicados, es necesaria la identificación a nivel de subespecie de *S. bovis*, ya que hemos demostrado que existen asociaciones características con diferentes cuadros clínicos. El estudio epidemiológico también justifica esta subespeciación para la búsqueda de biomarcadores específicos que pudiesen servir como proteínas inmunogénicas con valor pronóstico o de diagnóstico precoz. En nuestra experiencia podríamos aventurar una especificidad de huésped dentro de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, ya que hemos detectado diferencias entre las cepas de origen animal y las de origen humano. La mayor limitación con la que nos encontramos es que en el momento de caracterizar las bacterias, el proceso carcinogénico ya lleva años de evolución, y no conocemos con exactitud el papel de la microbiota actual, que por otro lado puede ser muy diferente de la que existió en estadios iniciales. Sin duda, las técnicas de pisequenciación nos ayudarán en un futuro próximo a entender el verdadero papel que juega la microbiota en el ser humano tanto en la población sana como en los procesos carcinogénicos, incluyendo la evolución en el tiempo.



---

# Conclusiones

---

“ El éxito no se logra con la  
suerte, es el resultado de un  
esfuerzo constante”

---

Anónimo

---





## VI.- CONCLUSIONES

1. Se ha puesto a punto un nuevo esquema de Serología Múltiple basado en la tecnología Luminex para la valorar la respuesta inmunitaria frente a las proteínas específicas Gallo 1569, Gallo2039, Gallo2178 y Gallo2179 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y el CCR Dentro del esquema también se ha incluido la proteína FliC de *S. Typhimurium* y otras 15 proteínas previamente validadas para *H. pylori*.
2. Utilizando la colección de sueros de la plataforma de MCC-Spain la mayor diferencia entre casos y controles se detectó cuando se analizaron conjuntamente las proteínas Gallo2178 y Gallo2179. Para la proteína Gallo1569 no se encontró un punto de corte significativo por lo que fue descartada para posteriores análisis. Por tanto, se hace necesario la inclusión de nuevas proteínas específicas para completar el esquema de Serología Múltiple.
3. Se han detectado diferencias geográficas en la exposición a las proteínas Gallo2178 y Gallo 2179, que pueden justificar en parte las diferencias epidemiológicas detectadas en la prevalencia del CCR en nuestro país.
4. En general, la reactividad frente a las proteínas específicas de *H. pylori* fue mayor que frente a la proteína FliC de *S. Typhimurium* en los pacientes con CCR. La técnica de Serología Múltiple Luminex es más sensible que el ELISA convencional para la valoración de la respuesta inmunitaria frente a *H. pylori*.
5. Es importante identificar correctamente las subespecies de *S. bovis*, ya que existen importantes diferencias clínicas; *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* se asocia a procesos hepatobiliares mientras que la colonización/infección por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* se relaciona con procesos cancerígenos, fundamentalmente con el cáncer colorrectal.
6. La amplificación y secuenciación del gen *sodA* es el mejor método para identificar correctamente a estos aislados, seguido del API Strep 20 y métodos semiautomatizados como el WIDER. La identificación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS todavía no posee un adecuado poder discriminatorio en estos aislados.

7. El análisis de la diversidad genética de los aislados clínicos de *S. bovis* mediante PFGE reveló una población diversa y sin relación clonal, lo que sugiere que fuentes de adquisición independientes.
8. No se encontró ningún agrupamiento cuando se compararon los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* procedentes de humanos y de animales. La clusterización de estos aislados según su origen respalda la especialización asociada al huésped y su ambiente.
9. Las cepas de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* de origen humano presentaron mayores porcentajes de resistencia a los antibióticos, probablemente debido a exposiciones previas, excepto para eritromicina, que fue más alto en los aislados de origen animal.
10. En una cepa de origen animal se ha detectado la presencia del gen *vanA* que le confiere resistencia a glucopéptidos. Este elemento ha sido localizado en el cromosoma bacteriano y no es transferible mediante conjugación.
11. La secuenciación del genoma de la cepa número 78 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* con resistencia a glucopéptidos ha confirmado la integración del elemento Tn1546-like en el cromosoma bacteriano con una delección en la región VanY-VanZ y ha revelado la existencia de numerosas transposasas y/o secuencias de inserción que sin duda aumentan la plasticidad genética de este aislado.

---

# Bibliografía

---

“ Cambia tu forma de ver  
las cosas y las cosas  
cambiarán”

---

Anónimo

---



## VII.-BIBLIOGRAFÍA

**Abdulmir AS, Hafidh RR, Mahdi LK, Al-jeboori T, Abubaker F.** Investigation into the controversial association of *Streptococcus gallolyticus* with colorectal cancer and adenoma. BMC cancer 2009; 9:403.

**Abdulmir AS, Hafidh RR, Abu Bakar F.** The association of *Streptococcus bovis/ gallolyticus* with colorectal tumors: The nature and the underlying mechanisms of its etiological role. J Exp Clin Cancer Research 2011; 30:11.

**Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree E, Youree BE, Reece CA, Bukanov NO, Drazek ES, Roc BA y Berg DE.** Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol 1998; 28:37-53.

**Ahmed S, Macfarlane GT, Fite A, McBain AJ, Gilbert P, Macfarlane S.** Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. Appl Environ Microbiol 2007; 73:7435-42.

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2013 Atlanta, Ga: American Cancer Society 2013.

**Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Ramis R, Vida E, Lope V García-Pérez J, Boldo E, López-Abente G.** The striking geographical pattern of gastric cancer mortality in Spain: environmental hypotheses revisited. BMC Cancer 2009; 9: 316.

**Arthur M, Mollinas C, Depardieu F, Courvalin P.** Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4117. J Bacteriol 1993; 175:117-27.

**Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Paslier DL, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, MetaHIT Consortium, Weissenbach J,**

**Ehrlich SD, Bork P.** Enterotypes of the human gut microbiome. Nature 2011; 473:174-80.

**Ashida H, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C.** Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. Nat Chem Biol 2012; 8:36-45.

**Balkwill F, Mantovani A.** Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. Clin Pharmacol Ther 2010; 87:401-6.

**Bauer E, Williams BA, Smidt H, Verstegen MW, Mosenthin R.** Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. Curr Issues Intest Microbiol 2006; 7:35-51.

**Beck M, Frodl R, Funke G.** Comprehensive study of strains previously designated *Streptococcus bovis* consecutively isolated from human blood cultures and emended description of *Streptococcus gallolyticus* and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*. J Clin Microbiol 2008; 46:2966-72.

**Bellanger X, Roberts AP, Morel C, Choulet F, Pavlovic G, Mullany P, Decaris B, Guedon G:** Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICES<sub>T1</sub> and ICES<sub>T3</sub> from *Streptococcus thermophilus*. J Bacteriol 2009; 191:2764-75.

**Biarç J, Nguyen IS, Pini A, Gossé F, Richert S, Thiersé D, Van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Raul F, Klein JP, Schöller-Guinard M.** Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis*). Carcinogenesis 2004; 25:1477-84.

**Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, Perez-Perez G, Blaser MJ, Relman DA.** Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:732-7.

**Bingham SA, Day NE, Luren R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjønneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M, Gonzalez CA, Keg TJ, Trichopoulou A, Nassen A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli**

- E. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003; 361:1496-501.
- Blaser MJ, Chyou PH, Nomura A.** Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. *Cancer Res* 1995; 55:562-5.
- Blaser MJ, Berg DE.** *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 2001; 107:767-73.
- Boleij A, Muytjens CM, Bukhari SI, Cayet N, Glaser P, Hermans PW, Swinkels DW, Bolhuis A, Tjalsma H.** Novel clues on the specific association of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* with colorectal cancer. *J Infect Dis* 2011; 203:1101-9.
- Boleij A, Dutilh BE, Kortman GA, Roelofs R, Laarakkers CM, Engelke UF, Tjalsma H.** Bacterial Responses to a simulated colon tumor microenvironment. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11:851-62.
- Boleij A, Roelofs R, Danne C, Bellais S, Dramsi S, Kato I, Tjalsma H.** Selective antibody response to *Streptococcus gallolyticus* pilus proteins in colorectal cancer patients. *Cancer Prev Res* 2012; 6:260-5.
- Boleij A, Tjalsma H.** Gut bacteria in health and disease: a survey on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. *Biol Rev Camb Philos. Soc* 2 Feb 2012.
- Boleij A, Tjalsma H.** The itinerary of *Streptococcus gallolyticus* infection in patients with colonic malignant disease. *Lancet Infect Dis* 2013; 13:719-24.
- Bulajic M, Stimec B, Jesenofsky R, Kecmanovic D, Ceranic M, Kostic N, Schneider-Brachert W, Lowenfels A, Maisonneuve P, Löhr JM.** *Helicobacter pylori* in colorectal carcinoma tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16:631-3.
- Burnett-Hartman AN, Newcomb PA, Potter JD.** Infectious agents and colorectal cancer: a review of *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, JC virus, and human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17:2970-9.
- Burns CA, McCaughey R, Lauter CB.** The association of *Streptococcus bovis* fecal carriage and colon neoplasia: possible relationship with polyps and their premalignant potential. *Am J Gastroenterol* 1985; 80:42-6.
- Canli PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L, Naslain D, Neyrinck A, Lambert DM, Muccioli GG, Delzenne NM.** Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009; 58:1091-103.
- Carnero-Fernández M, Morano-Amado LE, Moreno-Carretero MJ, Corredera-García E, Romero-González J.** Meningitis por *Streptococcus bovis*: una causa poco frecuente de meningitis bacteriana en el paciente adulto. *Rev Neurol* 2002; 34:840-2.
- Castagnola E, Battaglia T, Bandettini R, Caviglia I, Baldelli I, Nantron M, Moroni C, Garaventa A.** *Clostridium difficile*-associated disease in children with solid tumors. *Support Care Cancer* 2009; 17:321-4.
- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R y Covacci A.** *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes typeI-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:14684-53.
- Center for Disease Control and Prevention. 2004. Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2003. U.S. Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, Ga.
- Chadfield MS, Christensen JP, Decostere A, Christensen H, Bisgaard M.** Geno- and phenotypic diversity of avian isolates of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis*) and associated diagnostic problems. *J Clin Microbiol* 2007; 45:822-7.
- Chamkha M, Patel BK, Traore A, Garcia JL, Labat M.** Isolation from a shea cake digester of a tannin-degrading *Streptococcus gallolyticus* strain that decarboxylates protocatechuic and hydroxycinnamic acids, and emendation of the species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52:939-44.
- Chopra I, Roberts M.** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology,

and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65:232-60.

**Clardrige J, Attori S, Zhang Q, Bartell J.** 16 S ribosomal DNA sequence analysis distinguishes biotypes of *Streptococcus bovis*: *Streptococcus bovis* biotype II/2 is a separate genospecies and the predominant clinical isolate in adult males. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1549-52.

**Clewell DB, Flannagan SE, Jaworski DD.** Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol* 1995; 3:229-36.

**Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI).** Performance and standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth informational supplement. Document M100-S20 2010. Wayne, PA.

**Conroy JM, Stevens RW, Hechemy KE.** Enzyme immunoassay. En: Balows A, Hausler WJ, Herrman KL, Isenberg HD, Schadomy HJ, eds. *Manual of microbiology*. Washinton: American Society for Microbiology 1994; 87-92.

**Corredoira JC, Alonso MP, García JF, Casariego E, Coira A, Rodríguez A, Pita J, Louzao C, Pombo B, López MJ, Varela J.** Clinical characteristics and significance of *Streptococcus salivarius* bacteremia and *Streptococcus bovis* bacteremia: a prospective 16-year study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24:250-5.

**Corredoira J, Alonso MP, Coira A, Casariego E, Arias C, Alonso D, Pita J, Rodríguez A, López MJ, Varela J.** Characteristics of *Streptococcus bovis* endocarditis and its differences with *Streptococcus viridans* endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27:285-91.

**Corredoira J, Alonso MO, Coira A, Varela J.** Association between *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis* II/2) bacteremia and noncolonic cancer. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1570.

**Corredoira J, Alonso MP, García-Garrote F, García-Pais MJ, Coira A, Rabuñal R, Gonzalez-Ramirez A, Pita J, Matesanz M, Velasco D, López-Álvarez MJ, Varela J.** *Streptococcus bovis* group and biliary tract infections: an analysis of 51 cases. *Clin Microbiol Infect* 2013, Jul 16.

**Corredoira JC, Alonso MP, García-Pais JF, Rabuñal R, García-Garrote F, López-Roses L,**

**Lancho A, Coira A, Pita J, Velasco D, López-Álvarez MJ, Tjalsma H, Varela J.** Is colonoscopy necessary in cases of infection by *Streptococcus bovis* biotype II? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013, Aug 11.

**Cover TL, Blaser JM.** Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1992; 267: 10570-5.

**Cover TL, Dooley CP, Blaser JM.** Characterization of and human serologic response to protein in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun* 1990; 58: 603-10.

**Crabtree JE, Taylor JD, Wyatt JI, Heatley RV, Shallcross TM, Tompkins DS, Rathbone BJ.** Mucosa IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet* 1991; 338: 332-5.

**Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède JP.** *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107:11537-42.

**Curado M, Edwards B, Shin H, Storm H.** *Cancer Incidence in Five Continents Vol. IX.* Lyon, France: IARC 2010.

**Danne C, Entenza JM, Mallet A, Briandet R, Debarbouille M, Nato F, Glaser P, Jouvion G, Moreillon P, Trieu-Cuot P, Dramsi S.** Molecular characterization of a *Streptococcus galloyticus* genomic island encoding a pilus involved in endocarditis. *J Infect Dis* 2011; 204:1960-70.

**De Herdt P, Haesebrouck F, Devriese LA, Ducatelle R.** Biochemical and antigenic properties of *Streptococcus bovis* isolated from pigeons. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2432-4.

**Devriese LA, Vandamme P, Pot B, Vanrobaeys M, Kersters K, Haesebrouck F.** Differentiation between *Streptococcus galloyticus* strains of human clinical and veterinary origins and *Streptococcus bovis* strains from the intestinal tracts of ruminants. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3520-3.

**D'Onghia V, Leoncini R, Carli R, Santoro A, Giglioni S, Sorbellini F, Marzocca G, Bernini A, Campagna S, Marinello E, Vannoni D.** Circulating gastrin and ghrelin levels in patients with colorectal cancer: correlation with tumour



- stage, *Helicobacter pylori* infection and BMI. Biomed Pharmacother 2007; 61:137-41.
- Dossumbekova A, Prinz C, Gerhard M, Brenner L, Backert S, Kusters JG, Schmid RM, Rad R.** *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastric inflammation. Gut 2006; 55:1360-1.
- DuPont AW, DuPont HL.** The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011; 8:523-31.
- Durante-Mangoni E, Bradley S, Selton-Suty C, Tripodi MF, Barsic B, Bouza E, Cabell CH, Ramos AI, Fowler V Jr, Hoen B, Konecny P, Moreno A, Murdoch D, Pappas P, Sexton DJ, Spelman D, Tattevin P, Miró JM, van der Meer JT, Utili R.** Current features of infective endocarditis in elderly patients: results of the International Collaboration on Endocarditis Prospective Cohort Study. Arch Intern Med 2008; 168:2095-103.
- Dussurget O, Cabanes D, Dehoux P, Lecuit M, Buchrieser C, Glaser P, Cossart P.** *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. Mol Microbiol 2002; 45:1095-106.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA.** Diversity of the human intestinal microbial flora. Science 2005; 308: 1635-8.
- Ellmerich S, Schöller M, Duranton B, Gosse F, Galluser M, Klein JP, Raul F.** Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. Carcinogenesis 2000; 21: 753-6.
- Epplein M, Pawlita M, Michel A, Peek RM Jr, Cai Q, Blot WJ.** *Helicobacter pylori* protein-specific antibodies and risk of colorectal cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2013; 22:1964-74.
- Ernst PB, Gold BD.** The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. Annu Rev Microbiol 2000 54; 615-40.
- Espeel B, Caulry C, Deltenre P, Mansvelt B, Vermonden J.** Multilobular liver abscess due to *Streptococcus bovis*. J Chir 2004; 141:404-5.
- Everhart JE.** Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. Gastrointestinal Clin North Am 2000; 29:559-78.
- Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI.** Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62:1157-70.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM.** Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer 2010; 127:2893-917.
- Fernández Guerrero ML.** Epidemiología y microbiología de la endocarditis infecciosa. Endocarditis infecciosa. Barcelona: Prous Science 2002; p. 3-14.
- Fernández-Ruiz M, Villar-Silva J, Llenas-García J, Caurcel-Díaz L, Vila-Santos J, Sanz-Sanz F, Chaves F, Guerra-Vales JM.** *Streptococcus bovis* bacteraemia revisited: clinical and microbiological correlates in a contemporary series of 59 patients. J Infect 2010; 61:307-13.
- Friedrichs C, Rodloff AC, Chhatwal GS, Schellenberger W, Eschrich K.** Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. J Clin Microbiol 2007; 45:2392-7.
- Gao L, Michael A, Weck MN, Arndt V, Pawlita M, Brenner H.** *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk: evaluation of 15 *Helicobacter pylori* proteins determined by novel multiplex serology. Cancer Res 2009; 65:6164-70.
- García-Closas R, Berenguer A, González CA.** Changes in food supply in Mediterranean countries from 1961 to 2001. Public Health Nutr 2006; 9:53-60.
- Garvie EI, Bramley AJ.** *Streptococcus bovis*—an approach to its classification and its importance as a cause of bovine mastitis. J Appl Bacteriol 1979; 46:557-66.
- Gavin PJ, Thomson RB Jr, Horng SJ, Yogeve R.** Neonatal sepsis caused by *Streptococcus bovis* variant (biotype II/2): report of a case and review. J Clin Microbiol 2003; 41:3433-5.
- Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R.** *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin

inhibits T lymphocyte activation. *Science* 2003; 301:1099-102.

**Green J, Czanner G, Reeves G, Watson J, Wise L, Roddam A, Beral V.** Menopausal hormone therapy and risk of gastrointestinal cancer: nested case-control study within a prospective cohort, and meta-analysis. *Int J Cancer* 2012; 130:2387-96.

**Giannitsioti E, Chirouze C, Bouvet A, Béguinot I, Delahaye F, Mainardi JL, Lelard M, Milhaila-Amrouche L, Moing VL, Hoen B.** Characteristics and regional variations of group D streptococcal endocarditis in France. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13:770-6.

**Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR.** Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol* 2010; 71:149-84.

**Giovannucci E, Wu K.** Cancers of the colon and rectum. In **Schottenfeld D, Fraumeni JF.** *Cancer Epidemiology and Prevention*. New York, NY: Oxford University Press 2006; 809-29.

**Gold JS, Bayar S, Salem SS.** Association of *Streptococcus bovis* bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy. *Arch Surg* 2004; 139:760-5.

**Gómez-Garcés JL, Gil Y, Burillo A, Wilhelmi I, Palomo M.** Cuadros clínicos asociados a bacteriemia causada por las nuevas especies incluidas en el antiguo grupo de *Streptococcus bovis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30:175-9.

**González-Juanatey C, Testa-Fernández A, González-Gay MA.** Septic discitis as initial manifestation of *Streptococcus bovis* endocarditis. *Int J Cardiol* 2006; 108:128-9.

**Grahn N, Hmani-Aifa M, Fransén K, Söderkvist P, Monstein HJ.** Molecular identification of *Helicobacter* DNA present in human colorectal adenocarcinomas by 16S rDNA PCR amplification and pyrosequencing analysis. *J Med Microbiol* 2005; 54:103-5.

**Grimont PAD, Weill F-X.** Antigenic Formulas of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9th ed. Paris: Institut Pasteur 2007.

**Guarner F, Malagelada JR.** Gut microbiota in health and disease. *Lancet* 2003; 361:512-9.

**Gupta A, Mandani R, Mukhtar H.** *Streptococcus bovis* endocarditis; a silent sign for colonic tumour. *Clorectal Dis* 2010; 12:164-71.

**Handwerger S, Skoble J.** Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:2446-53.

**Hardie JM.** Genus *Streptococcus* Rosenbach 1984, 22AL. En: **Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, editors.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins Co 1986; p. 1043-71.

**Hacker J, Carniel E.** Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO* 2001; 2:376-81.

**Harris JC, Dupont HL, Hornick RB.** Fecal leukocytes in diarrheal illness. *Ann Intern Med* 1972; 76:697-703.

**Hartwich A, Konturek SJ, Pierzchalski P, Zuchowicz M, Labza H, Konturek PC, Karczewska E, Bielanski W, Marlicz K, Starzynska T, Lawniczak M, Hahn EG.** *Helicobacter pylori* infection, gastrin, cyclooxygenase-2, and apoptosis in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2001; 16:202-10.

**Hayashi H, Sakamoto M, Kitahara M, Benno Y.** Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiol Immunol* 2003; 47:557-70.

**Hillenkamp F, Karas M.** Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol* 1990; 193:280-95.

**Hienz SA, Schennings T, Heimdahl A, Flock JI.** Collagen binding of *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in experimental endocarditis. *J Infectious Dis* 1998; 174:83-8.

**Hinse D, Vollmer T, Rückert C, Blom J, Kalinowski J, Knabbe C, Dreier J.** Complete genome and comparative analysis of *Streptococcus galloyticus* subsp. *galloyticus*, an emerging pathogen of infective endocarditis. *BMC Genomics* 2011; 12:400.

- Hinse D, Vollmer T, Erhard M, Welker M, Moore E, Kleesiek K, Dreier J. Differentiation of species of the *Streptococcus bovis/equines*-complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry in comparison to sodA sequence analyses. *Syst Appl Microbiol* 2011; 34:52-7.
- Hirota K, Osawa R, Nemoto K, Ono T, Miyake Y. Highly expressed human sialyl Lewis antigen on cell surface of *Streptococcus gallolyticus*. *Lancet* 1996; 347:760.
- Hoen B, Alla F, Selton-Suty C, Beguinot I, Bouvet A, Briancon S, Casalta JP, Danchin N, Delahaye F, Etienne J, Le Moing V, Lepout C, Mainardi JL, Ruimy R, Vandenesch F. Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France. *JAMA* 2002; 288:75-81.
- Hoen B, Chirouze C, Cabell CH, Selton-Suty C, Duchene F, Olaison L, Miro JM, Habib G, Abrutyn E, Eykyn S, Bernard Y, Marco F, Corey GR. Emergence of endocarditis due to group D streptococci: findings derived from the merged database of the International Collaboration on Endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24:12-6.
- Holzappel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld J. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41:85-101.
- Hoogkamp-Korstanje JA, Roelofs-Willemsse J. Comparative *in vitro* activity of moxifloxacin against Gram-positive clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:31.
- Hoshino T, Fujiwara T, Kilian M. Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. *J Clin Microbiol* 2005; 43:6073-85.
- <http://globocan.iarc.fr>
- <http://ioncommunity.lifetechnologies.com>
- Ikryannikova LN, Filimonova AV, Malakhova MV, Savinova T, Filimonova O, Ilina EN, Dubovickaya VA, Sidorenko SV, Govorun VM. Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Nov; 19:1066-71.
- Janulaityte-Gunther D, Kupcinskas L, Pavilonis A, Valuckas K, Wadstrom T, Andersen LP. Combined serum IgG response to *Helicobacter pylori* VacA and CagA predicts gastric cancer. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50:220-5.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao YP, Xu JQ, Thun MJ. Cancer Statistics, 2009. *Cancer J Clinicians* 2009; 59:225-49.
- Jones M, Helliwell P, Pritchard C, Tharakan J, Mathew J. *Helicobacter pylori* in colorectal neoplasms: is there an aetiological relationship? *World J Surg Oncol* 2007; 5:51.
- Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson G. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:15064-9.
- Jüttner S, Cramer T, Wessler S, Walduck A, Gao F, Schmitz F, Wunder C, Weber M, Fischer SM, Schmidt WE, Wiedenmann B, Meyer TF, Naumann M, Höcker M. *Helicobacter pylori* stimulates host cyclooxygenase-2 gene transcription: critical importance of MEK/ERK-dependent activation of USF1/-2 and CREB transcription factors. *Cell Microbiol* 2003; 5:821-34.
- Kato I, Boleij A, Kortman GA, Roelofs R, Djuric Z, Severson RK, Tjalsma H. Partial associations of dietary iron, smoking and intestinal bacteria with colorectal cancer risk. *Nutrition and cancer* 2013; 65:169-77.
- Killeen SD, Wang JH, Andrews EJ, Redmond HP. Bacterial endotoxin enhances colorectal cancer cell adhesion and invasion through TLR-4 and NF-kappaB-dependent activation of the urokinase plasminogen activator system. *Br J Cancer* 2009; 100:1589-602.
- Khafipour E, Li S, Plaizier JC, Krause DO. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:7115-24.
- Koo JH, Jalaludin B, Wong SK, Kneebone A, Connor SJ, Leong RW. Improved survival in young women with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2008; 103:1488-95.

- Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, Ojesina AI, Jung J, Bass AJ, Tabernero J, Baselga J, Liu C, Shivdasani RA, Ogino S, Birren BW, Huttenhower C, Garrett WS, Meyerson M. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; 22:292-8.
- Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D, Katsinelos P. New aspects of *Helicobacter pylori* infection involvement in gastric oncogenesis. *J Surg Res* 2008; 146:149-58.
- Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the cagA status. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1777-80.
- Kupferwasser I, Darius H, Muller AM, Mohr-Kahaly S, Westermeier T, Oelert H, Erbel R, Meyer J. Clinical and morphological characteristics in *Streptococcus bovis* endocarditis: a comparison with other causative microorganisms in 177 cases. *Heart* 1998; 80:276-80.
- Lan R, Reeves PR, Octavia S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect Genet Evol* 2009; 9:996-1005.
- Lancaster LE, Wintermeyer W, Rodnina MV. Colicins and their potential in cancer treatment. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 38:15-8.
- Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exper Med* 1933; 57:571-95.
- Landau DA, Blendis L, Lurie Y. *Streptococcus bovis* bacteremia associated with acute cholecystitis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40:454-6.
- Lazarovitch T, Shango M, Levine M, Brusovansky R, Akins R, Hayakawa K, Lephart PR, Sobel JD, Kaye KS, Marchaim D. The relationship between the new taxonomy of *Streptococcus bovis* and its clonality to colon cancer, endocarditis, and biliary disease. *Infection* 2013; 41:329-37.
- Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 2002; 15:482-92.
- Leclercq R, Huet C, Picherot M, Trieu-Cuot P, Poyart C. Genetic basis of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus gallolyticus* (*Streptococcus bovis*). *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1646-8.
- Lee R, Woo P, To A, Lau S, Yuen K. Geographical Difference of disease association in *Streptococcus bovis* bacteremia. *J Med Microbiol* 2003; 52:903-8.
- Limburg PJ, Stolzenberg-Solomon RZ, Colbert LH, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. *Helicobacter pylori* seropositivity and colorectal cancer risk: a prospective study of male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:1095-9.
- Lin IH, Liu TT, Teng YT, Wu HL, Liu YM, Wu KM, Chang CH, Hsu MT. Sequencing and comparative genome analysis of two pathogenic *Streptococcus gallolyticus* subspecies: genome plasticity, adaptation and virulence. *PLoS One* 2011; 6:20519.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012; 251364-75.
- López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gómez B. Cancer and other causes mortality in Spain in 2004. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III 2006.
- López-Abente G, Ramis R, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Gómez-Barroso D, Carrasco JM, Lope V, García-Pérez J, Boldo E, García-Mendizábal MJ. Atlas municipal de mortalidad por cáncer en España, 1989-1998. Instituto de Salud Carlos III. Madrid 2006.
- Luminex 100™ User Manual Version 1.7, LUMINEX CORPORATION, Texas. U.S.A, Marzo 2004. <http://luminexcorp.custhelp.com>.
- Mager DL. Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure? A review. *J Transl Med* 2006; 4:14.
- Maggio-Price L, Treuting P, Bielefeldt-Ohmann H, Seamons A, Drivdahl R, Zeng W, Lai L, Huycke M, Phelps S, Brabb T, Iritani BM. Bacterial infection of Smad3/Rag2 double-null mice with transforming growth factor- $\beta$  dysregulation as a model for studying inflammation-associated colon cancer. *Am J Pathol* 2009; 174:317-29.



- Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E.** European cancer mortality predictions for the year 2013. *Annals of Oncology* 2013.
- Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H.** Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol* 2008; 16:33-40.
- Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A, Tjalsma H.** Towards the human colorectal cancer microbiome. *PloS One* 2011; 6:20447.
- Martín E, Navas C, Martín-Vivaldi J, García-Tapia A, Martín-Herrera L.** Artritis séptica por *Streptococcus bovis* en cirrótico de etiología enólica. *Rev Esp Enferm Dig* 2003; 95:506-8.
- Matsumura M, Araki T, Yokogawa A.** *Streptococcus bovis* discitis and possible endocarditis. *Intern Med* 2000; 39:677.
- Mathur S, Singh R.** Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria--a review. *Int J Food Microbiol* 2005; 105:281-95.
- Maxam AM, Gilbert W.** A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:560-4.
- McCoy W, Manson JM.** Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid; report of a case. *J Med Assoc State Ala* 1951; 21:162-6.
- Medina L, Mora L, García V, Santos J.** Acute cholecystitis and bacteraemia due to *Streptococcus bovis* biotype II. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29:70-1.
- Meschede W, Zumbach K, Braspenning J, Scheffner M, Benitez-Bribiesca L, Luande J, Gissmann L, Pawlita M.** Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 1998; 36:475-80.
- Messenger AJM, Barclay R.** Bacteria, iron and pathogenicity. *Biochemical Education* 1983; 11:54-63.
- Meucci G, Tatarelle M, Vecchi M, Ranzi ML, Biguzzi E, Clerici E, de Franchis R.** High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with colonic adenomas and carcinomas. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25:605-7.
- Mevius D, Devriese L, Butaye P, Vandamme P, Verschure M, Veldman K.** Isolation of glycopeptides resistant *Streptococcus gallolyticus* strains with *vanA*, *vanB* and both *vanA* and *vanB* genotypes from faecal samples of veal calves in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42:275-6.
- Michel A, Waterboer T, Kist M, Pawlita M.** *Helicobacter pylori* multiplex serology. *Helicobacter* 2009; 14:525-35.
- Miki C, Tanaka K, Toiyama Y, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M.** Comparison of the prognostic value of inflammation-based pathologic and biochemical criteria in patients undergoing potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg* 2010; 251:389-90.
- Mizuno S, Morita Y, Inui T, Asakawa A, Ueno N, Ando T, Kato H, Uchida M, Yoshikawa T, Inui A.** *Helicobacter pylori* infection is associated with colon adenomatous polyps detected by high-resolution colonoscopy. *Int J Cancer* 2005; 117:1058-9.
- Moet GJ, Dowzicky MJ, Jones RN.** Tigecycline (GAR-936) activity against *Streptococcus gallolyticus* (*bovis*) and *viridans* group streptococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57:333-6.
- Moran AP, Prendergast MM, Appelmelk BJ.** Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immun Med Microbiol* 1996; 16:105-15.
- Morgan XC, Segata N, Huttenhower C.** Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends Genet* 2013; 29:51-8.
- Moreillon P.** Infective endocarditis. *Lancet* 2004; 363:139-49.
- Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R, Schäffer AA.** Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. *Bioinformatics* 2008; 24:1757-64.
- Mühlemann K, Graf S, Täuber MG.** *Streptococcus bovis* clone causing two episodes of endocarditis 8 years apart. *J Clin Microbiol* 1999; 37:862-3.
- Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG Jr, Bayer AS, Karchmer AW, Olaison L, Pappas Pa, Moreillon P, Chambers ST, Chu VH, Falcó V, Holland DJ, Jones P, Klein JL, Raymond NJ, Read KM, Tripodi MF,**

- Uttl R, Wang A, Woods CW, Labell Ch.** Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21<sup>st</sup> Century. The international Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study. *Arch Intern Med* 2009; 169:463-73.
- Murray M, Pizzorno J.** Encyclopedia of Natural Medicine. Rocklin, CA: Prima Publishing 1998; 143.
- Murray PR., Baron EJ, J. Jorgensen JH, Pfaller AM, Tenover FC, Tenover BC.** 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology; Washington, DC.
- Mylonakis E, Calderwood SB.** Infective endocarditis in adults. *N Engl J Med* 2001; 245:1318-30.
- Negrini R, Savio A, Poiesi C, Appelmelk BJ, Buffoli F, Paterlini A, Cesari P, Graffeo M, Vaira D, Franzin G.** Antigenic mimicry between *Helicobacter pylori* and gastric mucosa in the pathogenesis of body atrophic gastritis. *Gastroenterology* 1996; 111:655-65.
- Noble CJ.** Carriage of group D streptococci in the human bowel. *J Clin Pathol* 1978; 31:1182-6.
- Nomoto R, Tien le HT, Sekizaki T, Osawa R.** Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus galloyticus* isolated from humans and animals. *Jpn J Infect Dis* 2013; 66:334-6.
- Nougayrède JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Buchrieser C, Hacker J, Dobrindt U, Oswald E.** *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 2006; 313:848-51.
- O'Donovan L, Brooker JD.** Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus galloyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiol* 2001; 147:1025-33.
- O'Hara AM, Shanahan F.** The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006; 7:688-93.
- O'Toole PW, Claesson MJ.** Gut microbiota: changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *Int Dairy J* 2010; 20:281-91.
- Osawa R.** Formation of a clear zone on tannin-treated brain heart infusion agar by a *Streptococcus* sp. isolated from feces of koalas. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56:829-31.
- Osawa R, Whiley RA.** Effects of different acidulants on growth of '*Streptococcus milleri* group' strains isolated from various sites of the human body. *Lett Appl Microbiol* 1995; 20:263-7.
- Ouwehand A, Verlund S.** Health aspects of probiotics. *IDrugs* 2003; 6:573-80.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.** Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.
- Parsonnet J:** Bacterial infection as a cause of cancer. *Environ Health Perspect* 1995; 103:263-8.
- Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N and Vogelman H.** Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997; 40:297-301.
- Peek RM, Blaser MJ.** *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:28-37.
- Peek RM, Crabtree JE.** *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J Pathol* 2006; 208: 233-48.
- Phadnis SH, Ilver D, Janzon L, Normark S, Westblom TU.** Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994; 62:1557-65.
- Power S, O'Toole PW, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF.** Intestinal microbiota, diet and health. *Br J Nutr* 2013; 10:1-16.
- Poyart C, Pierre C, Quesne G, Pron B, Berche B, Trieu-Cuot P.** Emergence of vancomycin resistance from the genus *Streptococcus*: characterization of a VanB transferable determinant in *Streptococcus bovis*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1997; 41:24-9.
- Poyart, C., G. Quesne, and P. Trieu-Cuot.** Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52:1247-55.
- Puerto Alonso JL, Asencio Méndez C, Gómez Rodríguez F.** *Streptococcus bovis*: Un patógeno emergente. *Med Clin* 2007; 129:349-51.

- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing *Nature* 2010; 464:59-65.
- Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Role of the innate immune system and host commensal mutualism. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 308:1-18.
- Redston M. Epithelial neoplasms of the intestine. In: Odze RD, Goldblum JR, editors. *Surgical pathology of the tract, liver, biliary tract and pancreas*. 2<sup>nd</sup> edition. Pennsylvania, Philadelphia: Expertconsult, Saunders Elsevier, 2004.
- Ren Z, Gay R, Thomas A, Pae M, Wu D, Logsdon L, Mecsas J, Meydani SN. Effect of age on susceptibility to *Salmonella* Typhimurium infection in c57bl/6 mice. *Journal of medical microbiology* 2009; 58:1559-67.
- Renga M, Brandi G, Paganelli GM, Calabrese C, Papa S, Tosti A, Tomassetti P, Miglioli M, Biasco G. Rectal cell proliferation and colon cancer risk in patients with hypergastrinaemia. *Gut* 1997; 41:330-2.
- Rice LB, Carias LL, Donskey CL, Rudin SD. Transferable, plasmid-mediated vanB-type glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:963-4.
- Risch M, Radjenovic D, Han JN, Wydler M, Nydegger U, Risch L. Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria. *Swiss Med Wkly* 2010; 140:13095.
- Rodríguez-Avial I, Rodríguez-Avial C, Culebras E, Picazo JJ. In vitro activity of telithromycin against viridans group streptococci and *Streptococcus bovis* isolated from blood: antimicrobial susceptibility patterns in different groups of species. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:820-3.
- Rohmer L, Hocquet D, Miller SI. Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. *Trends Microbiol* 2011; 19:341-8.
- Romero B, Morosini MI, Loza E, Rodríguez-Baños M, Navas E, Cantón R, Campo RD. Reidentification of *Streptococcus bovis* isolates causing bacteremia according to the new taxonomy criteria: still an issue? *J Clin Microbiol* 2011; 49:3228-33.
- Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, Hoon J, Simons JF, Marran D, Myers JW, Davidson JF, Branting A, Nobile JR, Puc BP, Light D, Clark TA, Huber M, Branciforte JT, Stoner IC, Cawley SC, Lyons M, Fu Y, Homer N, Sedova M, Miao X, Reed B, Sabina J, Feierstein E, Schorn M, Alanjary M, Dimalanta E, Dressman D, Kasinskas R, Sokolsky T, Fidanza JA, Namsaraev E, McKernan KJ, Williams A, Roth GT, Bustillo J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 2011; 475:348-52.
- Ruiz del Barrio I, Naval Valle D, Bianco S, Agote Gemein A, Lerma Cancho A. Septicemia por *Streptococcus bovis* y espondilodiscitis. *An Med Interna* 2004; 21:153.
- Ruoff K, Miller S, Garner C, Ferraro M, Calderwood S. Bacteremia with *Streptococcus bovis* and *Streptococcus salivarius*: clinical correlates of more accurate identification of isolates. *J Clin Microbiol* 1989; 27:305-8.
- Rupf S, Breitung K, Schellenberger W, Merte K, Kneist S, Eschrich K. Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 267-273.
- Rusniok C, Couvé E, Da Cunha V, El Gana R, Zidane N, Bouchier C, Poyart C, Leclercq R, Trieu-Cuot P, Glaser P. Genome sequence of *Streptococcus gallolyticus*: insights into its adaptation to the bovine rumen and its ability to cause endocarditis. *J Bacteriol* 2010; 192:2266-76.
- De Sablet T, Piazzuelo MB, Shaffer CL, Schneider BG, Asim M, Chaturvedi R, Bravo LE, Sicinschi LA, Delgado AG, Mera RM, Israel DA, Romero-Gallo J, Peek RM Jr, Cover TL, Correa P, Wilson KT. Phylogeographic origin

of *Helicobacter pylori* is a determinant of gastric cancer risk. Gut 2011; 60:1189-95.

**Sambrook J, Frischt E, Maniatis T.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor 1989. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

**Sams RN, Haltiner AL, Botse-Baidoo E, Coomer C, Moosariparambil M, Catto BA.** First report of *Streptococcus bovis*-associated acute cholecystitis in North America. J Clin Gastroenterol 2008; 42:959-60.

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74:5463-7.

**Dos Santos Silva I.** Cancer epidemiology: Principles and methods. International Agency for Research on Cancer 1999.

**Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F, Capocaccia R.** EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995–1999. Results and commentary. Eur J Cancer 2009; 45:931–91.

**Sasaki E, Osawa R, Nishitani Y, Whiley RA.** Development of a diagnostic PCR assay targeting the Mn-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) for identification of *Streptococcus galloyticus*. J Clin Microbiol 2004; 42:1360–2.

**Sasaki E, Shimada T, Osawa R, Nishitani Y, Spring S, Lang E.** Isolation of tannin-degrading bacteria isolated from feces of the Japanese large wood mouse, *Apodemus speciosus*, feeding on tannin-rich acorns. Syst Appl Microbiol 2005; 28:358–65.

**Savage DC.** Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. Annu Rev Nutr 1986; 6:155–78.

**Salyers AA, Gupta A, Wang Y.** Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. Trends Microbiol 2004; 12:412–6.

**Schlegel L, Grimont F, Ageron E, Grimont PA, Bouvet A.** Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus galloyticus* subsp. *galloyticus* subsp. nov., *Streptococcus galloyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *Streptococcus galloyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2003; 53:631–45.

**Schottenfeld D, Fraumeni J, editors.** Cancer epidemiology and prevention. Oxford: Oxford University Press; 1996.

**Seher C, Thierfelder W, Dortsch R.** *Helicobacter pylori*-prevalence in the German population [in German]. Gesundheitswesen 2000; 22:598–603.

**Sehr P, Zumbach K, Pawlita M.** A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S-transferase: validation for HPV serology. J Immunol Methods 2001; 253:153–62.

**Sekizaki T, Nishiya H, Nakajima S, Nishizono M, Kawano M, Okura M, Takamatsu D, Nishino H, Ishiji T, Osawa R.** Endocarditis in chickens caused by subclinical infection of *Streptococcus galloyticus* subsp. *galloyticus*. Avian Dis 2008; 52:183–6.

**Sharpe CR, Siemiatycki J, Rachet B.** Effects of alcohol consumption on risk of colorectal cancer among men by anatomical subsite. Cancer Causes and Control 2002; 13:483–91.

**Sherburne R, Taylor DE.** *Helicobacter pylori* expresses a complex surface carbohydrate, Lewis X. Infect Immun 1995; 63:4564–8.

**Shibata Y, Tien LH, Nomoto R, Osawa R.** Development of a multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus galloyticus*. Microbiology 2013; Oct 16.

**Shmueli H, Passaro D, Figer A, Niv Y, Pitlik S, Samara Z, Korean R, Yahav J.** Relationship between *Helicobacter pylori* CagA status and colorectal cancer. Am J Gastroenterol 2001; 96:3406–10.

**Sicinschi LA, Correa P, Peek RM, Camargo MC, Piazuelo MB, Romero-Gallo J, Hobbs SS, Krishna U, Delgado A, Mera R, Bravo LE, Schneider BG.** CagA C-terminal variations in *Helicobacter pylori* strains from Colombian patients with gastric precancerous lesions. Clin Microbiol Infect 2010; 16:369–78.

**Siddheshwar RK, Muhammad KB, Gray JC, Kelly SB.** Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in patients with colorectal polyps and colorectal carcinoma. Am J Gastroenterol 2001; 96:84–8.

**Simoons-Smit IM, Appelmelk BJ, Verboom T, Negrini R, Penner JL, Aspinall GO, Moran AP, Fei SF, Shi BS, Rudnica W, Savio A, de Graaff J.** Typing of *Helicobacter pylori* with monoclonal



antibodies against Lewis antigens in lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2196-200.

Soler AP, Miller RD, Laughlin KV, Carp NZ, Klurfeld DM, Mullin JM. Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* 1999; 20:1425-31.

Song H, Michel A, Nyrén O, Ekström AM, Pawlita M, Ye W. A CagA-independent cluster of antigens related to the risk of non-cardia gastric cancer: Associations between *Helicobacter pylori* antibodies and gastric adenocarcinoma explored by multiplex serology. *Int J Cancer* 2013; Nov 20.

Stewart CS, Flint HJ, Bryant MP. The rumen bacteria. in the rumen microbial ecosystem, eds Hobson PN, Stewart CS. 1997. (Blackie Academic and Professional, London, England), 2nd ed. pp 10-72.

Stewart BW, Kleihues P, editors. World Cancer Report 2003. Lyon, IARC Press.

Streit JM, Steenbergen JN, Thorne GM, Alder J, Jones RN. Daptomycin tested against 915 bloodstream isolates of viridans group streptococci (eight species) and *Streptococcus bovis*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:574-8.

Strofilas A, Lagoudianakis EE, Seretis C, Pappas A, Koronakis N, Keramidaris D, Koukoutsis I, Chrysikos I, Manouras I, Manouras A. Association of *Helicobacter pylori* infection and colon cancer. *J Clin Med Res* 2012; 4:172-6.

Su Y, Miao B, Wang H, Wang C, Zhang S. Splenic Abscess Caused by *Streptococcus galloyticus* subsp. *pasteurianus* as Presentation of a Pancreatic Cancer. *J Clin Microbiol* 2013; 51:4249-51.

Tanney D, Conley SB. Fatal *Streptococcus bovis* sepsis in an infant on peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol* 1997; 11:390-1.

Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, Muñoz-Tamayo R, Paslier DL, Nalin R, Dore J, Leclerc M. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol* 2009; 11:2574-84.

Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ. A genomic perspective on protein families. *Science* 1997 Oct 24; 278:631-7.

Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin EV, Krylov DM, Mazumder R, Mekhedov SL, Nikolskaya AN, Rao BS, Smirnov S, Sverdlov AV, Vasudevan S, Wolf YI, Yin JJ, Natale DA. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 2003; 4.

Telford JL, Barocchi MA, Margarit I, Rappuoli R, Grandi G. Pili in grampositive pathogens. *Nat Rev* 2006; 4:509-19.

Thorburn CM, Friedman GD, Dickinson CJ, Vogelman JH, Orentreich N, Parsonnet J. Gastrin and colorectal cancer: a prospective study. *Gastroenterology* 1998; 115:275-80.

Tilg H. Obesity, metabolic syndrome, and microbiota: multiple interactions. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44:16-8.

Tindall BJ, Grimont PA, Garrity GM, Euzéby JP. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005; 55:521-4.

Tjalsma H, Boleij A, Kato I. 2012. Bacteria and cancer, in Khan AA. *Streptococcus bovis* and colorectal cancer; p. 61-78. Springer Netherlands.

Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature reviews Microbiology* 2012; 10:575-82.

Toprak NU, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, Soyletir G. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:782-6.

Tripodi MF, Adinolfi LE, Ragone E. *Streptococcus bovis* endocarditis and its association with chronic liver disease: underestimated risk factor. *Clin Infect Dis* 2004; 38:1394-400.

Tripodi MF, Fortunato R, Utili R, Triassi M, Zarrilli R. Molecular epidemiology of *Streptococcus bovis* causing endocarditis and bacteraemia in Italian patients. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:814-9.

Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. A role for the gut microbiota in energy harvesting? *Gut* 2010; 59:1589-90.

- Tsai F, Coyle WJ.** The microbiome and obesity: is obesity linked to our gut flora? *Curr Gastroenterol Rep* 2009; 11:307-13.
- Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI.** The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 2009.
- Van Den Bogaard AE, Stobberingh EE.** Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14:327-35.
- Verdecchia A, Guzzinati S, Francisci S, de Angelis R, Bray F, Allemani C, Tavilla A, Santaquilani M, Sant M.** Survival trends in European cancer patients diagnosed from 1988 to 1999. *Eur J Cancer* 2009; 45:1042-66.
- Vergara-López S, de Alarcón A, Mateos-Gómez A, Georgieva RI, González-Nieto JA, Guerrero Sánchez F, Huaroc Roca E, Jarilla Fernández F, Pérez Rivera AA, Lepe JA, García López MV, Corzo Delgado JE.** Análisis descriptivo de las enfermedades asociadas a bacteremia por *Streptococcus bovis*. Sugerencia de un primer protocolo de estudio. *Med Clin (Barc)* 2011; 137:527-32.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL.** Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319:525-32.
- Vogelstein B, Kinzler KW.** The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9:138-41.
- Vollmer T, Hinse D, Kleesiek K, Dreier J.** Interactions between endocarditis-derived *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolates and human endothelial cells. *BMC Microbiol* 2010; 10:78.
- Waterboer T, Sehr P, Michael KM, Franceschi S, Nieland JD, Joos TO, Templin MF, Pawlita M.** Multiplex human papillomavirus serology based on in situ-purified glutathione s-transferase fusion proteins. *Clin Chem* 2005; 51:1845-53.
- Wang SM, Deighton MA, Capstick JA, Gerraty N.** Epidemiological typing of bovine streptococci by pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiol Infect* 1999; 123:317-24.
- Wang XM, Huycke MM.** Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells. *Gastroenterology* 2007; 132:551-61.
- Weeks DL, Eskandari S, Scott R, Sachs G.** A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* 2000; 287: 482-5.
- Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinsson KG, Leclercq R, Lester CH, Lillie M, Novais C, Olsson-Liljequist B, Peixe LV, Sadowy E, Simonsen GS, Top J, Vuopio-Varkila J, Willems RJ, Witte W, Woodford N.** Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill* 2008. Review.
- Welker M, Moore ERB.** Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol* 2011; 34:2-11.
- Williamson R, Calderwood SB, Moellering RC Jr, Tomasz A.** Studies on the mechanism of intrinsic resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in group D streptococci. *J Gen Microbiol* 1983; 129:813-22.
- Wilkins HR, Doucet K, Duke V, Morra A, Johnson N.** Estrogen prevents sustained COLO-205 human colon cancer cell growth by inducing apoptosis, decreasing c-myc protein, and decreasing transcription of the anti-apoptotic protein bcl-2. *Tumour Biol* 2010; 31:16-22.
- Wirth HP, Yang M, Karita M, Blaser MJ.** Expression of the human cell surface glycoconjugates Lewis X and Lewis Y by *Helicobacter pylori* isolates is related to *cagA* status. *Infect Immun* 1996; 64:4598-605.
- Woodford N, Adebiyi AM, Palepou MF, Cookson BD.** Diversity of VanA glycopeptide resistance elements in enterococci from humans and nonhuman sources. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:502-8.
- Wroblewski LE, Peek RM Jr, Wilson KT.** *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23:713-39.
- Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, Huso DL, Brancati FL, Wick E,**

**McAllister F, Housseau F, Pardoll DM, Sears CL.** A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med* 2009; 15:1016-22.

**Yamaoka Y.** Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7:629-41.

**Zarkin BA, Lillemoe KD, Cameron JL, Efron PN, Magnuson TH, Pitt HA.** The triad of *Streptococcus bovis* bacteremia, colonic pathology, and liver disease. *Ann Surg* 1990; 211:786-91.

**Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W.** A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 2000; 7:203-14.

**Zhang Y, Hoffmeister M, Weck MN, Chang-Claude J, Brenner H.** *Helicobacter pylori* infection and colorectal cancer risk: evidence from a large population-based case-control study in Germany. *Am J Epidemiol* 2012; 175:441-50.

**Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM.** High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* 2008; 57:1605-15.

**Zumkeller N, Brenner H, Zwahlen M, Rothenbacher D.** *Helicobacter pylori* infection and colorectal cancer risk: a metaanalysis. *Helicobacter* 2006; 11:75-80.

---

# Anexos

---

...es realmente un nuevo  
comienzo.

---



The aim of this doctoral thesis was the study of the association between the **colorectal cancer (CCR)** and some microorganisms of our intestinal microbiota. The principal studied agent was *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, though also we have been interested in *Helicobacter pylori* and *Salmonella* *Thypimurium*, because the importance of these microorganism in the development of the CCR. Our aim was a serological study using a Multiplex Serology platform based on the technology Luminex. A total of 1.512 sera were analyzed from a collection of patients with CCR and the control group thanks to a collaboration agreement whit MCC-Spain (CIBERESP). Other important part of this thesis was the reclassification, according with the current taxonomy, of the isolates previously designated like *S. bovis*. The importance of this reclassification was the specific associations of the subspecies with the different clinical features of the patients. Finally, in order to increase our knowledge about this microorganism, there has been compared the microbiological characteristics and antibiotic sensibility of a collection of isolated of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* of human and animal origins. Has been detected the presence of a resistant genetic element characterized by massive sequence in one calf isolate.



- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- ARN: Ácido Ribonucleico
- CagA: Citotoxina asociado al antígeno A
- CCR: Cáncer colorrectal
- CLSI: *Clinical Laboratories Standard Institute*
- CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
- dNTP: Deoxinucleótido Trifosfato
- EI: Endocarditis infecciosa
- ELISA: Ensayo de inmunoabsorción enzimática
- GC: Glutathione-caseína
- GST: Glutathione-S-transferasa
- H. pylori*: *Helicobacter pylori*
- IC 95%: Intervalo de Confianza del 95%
- Ig: Inmunoglobulina
- IMF: Intensidad Media de la Fluorescencia
- Omp: Proteína de membrana externa
- OR: Odds ratio
- cag* PAI: Isla de patogenicidad *cag*
- PBS: Solución salina tamponada con fosfato
- PCR: Polymerase Chain Reaction; Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PFGE: Pulse-Field Gel Electrophoresis; Electroforesis en geles de campo pulsado
- rpm: revoluciones por minuto
- S. bovis*: *Streptococcus bovis*
- S. gallolyticus*: *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*S. bovis* biopito I)
- S. lutetiensis*: *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (*S. bovis* biopito II/1)
- S. pasteurianus*: *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (*S. bovis* biopito II/2)
- Strep-PE: Estreptavidina R-ficoeritrina
- S.* Typhimurium: *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium
- subsp.: Subspecies
- VacA: Toxina A con actividad vacuolizante





**Figura 1.-** Incidencia estimada (casos nuevos por 100.000 y año) para cáncer colorrectal para hombres (<http://globocan.iarc.fr>). (pág 21)

**Figura 2.-** Incidencia estimada (casos nuevos por 100.000 y año) para cáncer colorrectal para mujeres (<http://globocan.iarc.fr>). (pág 21)

**Figura 3.-** Mapa de mortalidad para el CCR en la población española (Atlas Municipal de Mortalidad por Cáncer en España., 1989-1998). (pág 22)

**Figura 4.-** Diferencias filogenéticas entre “enterotipos” (Aruguman y cols., 2011). (pág 24)

**Figura 5.-** Mapa de la diversidad del microbioma humano (Morgan y cols., 2013). (pág 25)

**Figura 6.-** Cambios de la microbiota a lo largo de todo el tracto gastrointestinal: (a) Variaciones del número de bacterias a través del tracto gastrointestinal; (b) Factores que afectan en el establecimiento y mantenimiento de la microbiota, así como los que influyen en su composición (Power y cols., 2013). (pág 26)

**Figura 7.-** Modelo de asociación de la producción endocarditis por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y el CCR (Boleij y cols., 2011). (pág 33)

**Figura 8.-** Imagen por microscopia electrónica de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (A) y *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* (B), donde se pueden apreciar las diferencias entre sus estructuras de superficie (Boleij y cols., 2011). (pág 35)

**Figura 9.-** Hipótesis de cómo se produce la proliferación y paso a través del epitelio de la mucosa alterada al torrente sanguíneo de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (Tjalsma y cols., 2012). (pág 36)

**Figura 10.-** Esquema del elemento genético Tn1546. (pág 38)

**Figura 11.-** Interacción multifactorial que contribuye al desarrollo del cáncer gástrico (Wroblewski y cols., 2012). (pág 39)

**Figura 12.-** Modelo propuesto para el cáncer colorrectal “A bacterial driver-passenger model” (Tjalsma y cols., 2012). (pág 42)

**Figura 13.-** Mapa geográfico de la recogida de muestras en España. (pág 43)

**Figura 14.-** Representación del proceso de lectura de las microesferas empleadas por el Sistema xMAP de Luminex. (pág 45)

**Figura 15.-** Esquema serología múltiple para la determinación de anticuerpos (modificado del protocolo descrito por Waterboer y cols., 2005). (pág 46)

**Figura 16.-** Esquema de trabajo MALDI-TOF MS (Bruker, Alemania). (pág 48)

**Figura 17.-** Esquema de un pocillo del chip del sistema de secuenciación Ion Torrent. Cuando se incorpora un nucleótido, se libera un H<sup>+</sup> produciéndose un cambio de pH. (pág 49)

**Figura 18.-** Esquema del ensayo ELISA. (pág 58)

**Figura 19.-** Resumen esquemático del proceso completo del sistema de secuenciación Ion Torrent (<http://ioncommunity.lifetechnologies.com/>). (pág 71)

**Figura 20.-** Distribución de la reactividad a las proteínas Gallo2039, Gallo2178 y Gallo2179 de forma individual, según el grupo de edad. (pág. 77)

**Figura 21.-** Distribución de la población según grupo el sexo para cada una de las proteínas específicas Gallo2039, Gallo2178 y Gallo2179 de forma individual. (pág 79)

**Figura 22.-** Distribución geográfica de la población de casos y controles en función de la ciudad de recogida de las muestras y su relación con las proteínas Gallo2039, Gallo2178 y Gallo2179 de forma individual. (pág80)

**Figura 23.-** Distribución por edad de los casos y controles pareados cuando se analizaron conjuntamente las proteínas Gallo2178 y Gallo2179. (pág 81)

**Figura 24.-** Distribución por edad de la población de casos y controles al estudiar la reactividad a la proteína FliC. (pág 82)

**Figura 25.-** Distribución de los casos y controles considerados sero-positivos frente a *H. pylori* según la edad. (pág 83)

**Figura 26.-** Representación esquemática de la concordancia y discrepancia entre las diferencias dos técnicas diferentes (ELISA *vs* Serología múltiple) para la evaluación de la respuesta serológica frente a *H. pylori*. (pág 85)

**Figura 27.-** Representación gráfica de las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante la secuenciación del gen 16 ARNr. (pág 87)

**Figura 28.-** Representación gráfica de las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante la secuenciación del gen *sodA* (n=48). (pág 88)

**Figura 29.-** Comparación secuencias aminoacídicas de las proteínas SodA en los diferentes alelos detectados. (pág 89)

**Figura 30.-** Número casos/año de bacteriemias en el hospital Ramón y Cajal identificados como *S. bovis* durante el periodo 2003-2010. (pág 91)

**Figura 31.-** Dendrograma realizado con el software Phorertix 5.0 para analizar la relación genética mediante el análisis de los patrones de PFGE. (pág 93)

**Figura 32.-** Dendrograma patrón de PFGE realizado con el software Phoretix 5.0 para los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. (pág 95)

**Figura 33.-** Antibiógrama en placa donde se puede observar la resistencia a los glucopéptidos de la cepa número 78 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. (pág 97)

**Figura 34-** Fotografía de la membrana tras la digestión con la enzima de restricción *CeuI* y de las membranas de hibridación con las sondas específicas de productos de PCR *vanA* y 16S ARNr. En la cepa de *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* aparece una banda correspondiente con la presencia del gen *vanA* en el mismo lugar donde ya apareció una banda cuando la hibridación de la membrana se realizó con el gen 16S ARNr. (pág 99)

**Figura 35.-** Tn1546 de la cepa número 78 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* de procedencia animal. (pág 98)

**Figura 36.-** Comparación del genoma de la cepa número 78 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* con las cepas de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC BAA-2069, ATCC 43133 y UCN34. (pág 100)

**Figura 37.-** Clasificación funcional de los genes ortólogos (COGs) de la cepa número 78 de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. (pág 102)



- Tabla 1.-** Características fenotípicas de los principales grupos de *Streptococcus* spp. (pág 29)
- Tabla 2.-** Pruebas bioquímicas útiles para la identificación de los diferentes aislados de *S. bovis* en humanos. (pág 30)
- Tabla 3.-** Etiología de la endocarditis infecciosa. (pág 31)
- Tabla 4.-** Aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* para el estudio de la diversidad genética y la sensibilidad antimicrobiana. (pág 62)
- Tabla 5.-** Cebadores específicos y condiciones de PCR usados para la reclasificación taxonómica de aislados de *S. bovis* y resistencia antibiótica del *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. (pág 63)
- Tabla 6.-** Cebadores específicos y condiciones utilizadas en las PCRs solapantes para la caracterización molecular del Tn1546 (Woodford y cols., 1998). (pág 64)
- Tabla 7.-** Asociación CCR con la respuesta inmunitaria a las proteínas de los pili de forma individual usando el punto como corte el 10% de los controles sero-positivos. (pág 76)
- Tabla 8.-** Asociación CCR con la respuesta inmunitaria al conjunto de proteínas de los pili. (pág 77)
- Tabla 9.-** Distribución de los resultados serológicos de *H. pylori* según el sexo. (pág 82)
- Tabla 10.-** Comparación de los resultados obtenidos mediante el método ELISA *vs* Serología Múltiple en los casos para hombres y mujeres según la edad. (pág 84)
- Tabla 11.-** Comparación de los resultados obtenidos mediante el método ELISA *vs* Serología Múltiple en el grupo control para hombres y mujeres según la edad. (pág 84)
- Tabla 12.-** Identificación de los aislados de *S. bovis* según el sistema de identificación utilizado. (pág 90)
- Tabla 13.-** Principales características clínicas de los pacientes con bacteriemia por *S. bovis*. (pág 92)
- Tabla 14.-** Resistencia antibiótica de los aislados de *S. bovis*. (pág 94)
- Tabla 15.-** Resistencia antibiótica de los aislados de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. (pág 96)

